QUERVERNETZUNG DES RIBOSOMEN - EF-TU KOMPLEXES AUS ESCHERICHIA COLI MIT METHYL - 4 - MERCAPTO - BUTYRIMIDAT

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Fabian

aus Berlin

1976

QUERVERNETZUNG DES RIBOSOMEN - EF-TU KOMPLEXES AUS ESCHERICHIA COLI MIT METHYL - 4 - MERCAPTO - BUTYRIMIDAT

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ursula Fabian

aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-G. Wittmann

2. Gutachter: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 1976

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	**Einleitung**	
1.	Funktion der Ribosomen	3
2.	Bindung von EF-Tu an die Ribosomen	5
3.	Thematik der vorliegenden Arbeit	8
II.	**Material und Methoden**	
1.	Material	11
2.	Methoden	13
2.1.	Wachstumsbedingungen	13
2.2.	Aufarbeitung der Zellen	13
2.3.1.	Präparation der ribosomalen Untereinheiten	13
2.3.2.	Isolierung der 30S und 50S Untereinheiten aus der Saccharose-Lösung	14
2.4.	Reinigung von EF-Tu	14
2.5.	Radioaktive Markierung von 50S und EF-Tu	16
2.5.1.	Radioaktive Markierung von EF-Tu	16
2.5.2.	Radioaktive Markierung von 50S	17
2.6.	Reaktionsansätze zur Bestimmung biologischer Aktivitäten	18
2.6.1.	Austausch von an EF-Tu gebundenem GDP gegen (^{3}H)GDP	18
2.6.2.	Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese	19
2.6.3.	Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen	20
2.6.4.	Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen	21
2.7.	Isolierung des 70S·(^{3}H)EF-Tu Komplexes	21
2.7.1.	Sedimentation des Komplexes über 5% Saccharose	21
2.7.2.	Gradientenzentrifugation zur Isolierung des 70S·(^{3}H)EF-Tu Komplexes	21
2.8.	Gelelektrophorese	22
2.8.1.	Acrylamid-Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese	22

		Seite
2.8.2.	Mikro-zwei-dimensionale Gelelektrophorese	23
2.8.3.	Mini-zwei-dimensionale Gelelektrophorese	26
2.9.	Präparation der Aminoacyl-Synthetase-Enzyme aus Escherichia coli	26
2.1o.	Präparation von (^{14}C)Phe-tRNS	27
2.11.	Quervernetzung von Protein mit Methyl-3-Mercapto-Butyrimidat	28
2.11.1.	Quervernetzung von Aldolase	28
2.11.2.	Quervernetzung von ribosomalen 5oS Untereinheiten	29
2.11.3.	Quervernetzung von (^{3}H)EF-Tu und EF-Tu	29
2.12.	Salzwaschung von Ribosomen	29
2.13.	Extraktion von ribosomalen Proteinen	3o
2.14.1.	Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu über Biogel P-15o	3o
2.14.2.	Affinitäts-Chromatographie	3o
2.14.2.1.	Anreicherung von Globulinen	3o
2.14.2.2.	Proteinkupplung an Sepharose	31
2.14.2.3.	Affinitäts-Chromatographie	31

III. Ergebnisse

1.1.	Reinigung von EF-Tu	33
1.2.	Überprüfung der Reinigungsschritte	35
1.3.	Molekulargewichtsbestimmung	36
1.4.	Aktivität von EF-Tu bei der Bindung von (^{3}H)GDP	37
1.5.	Aktivität von EF-Tu in der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese	38
2.1.	Radioaktive Markierung von EF-Tu	39
2.1.1.	Reaktionsbedingungen für die radioaktive Markierung von EF-Tu	4o

		Seite
2.1.1.1.	Abhängigkeit der Aktivität von EF-Tu vom Puffer und vom pH	4o
2.1.1.2.	Abhängigkeit der Aktivität des EF-Tu von der Formaldehyd- und (^{3}H)Borhydrid-konzentration	41
2.2.	Elektrophoretische Eigenschaften des radioaktiv markierten EF-Tu	44
3.	Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen und Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu-Komplexes	45
3.1.	Optimierung des Testansatzes	45
3.2.	Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes	49
4.	Quervernetzung von Proteinen mit Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat	53
4.1.	Quervernetzung von Aldolase	53
4.2.	Quervernetzung von EF-Tu und ribosomalem Protein	55
4.2.1.	Quervernetzung von ribosomalen 5oS Untereinheiten	55
4.2.1.1.	Biologische Aktivität von 5oS$_{SH}$ Untereinheiten	56
4.2.1.2.	Sedimentationseigenschaften quervernetzter 5oS Untereinheiten	58
4.2.2.	Quervernetzung von EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu	59
4.2.2.1.	Biologische Aktivität von EF-Tu$_{SH}$ und (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$	59
4.2.2.2.	Konformation von quervernetztem EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu	59
4.3.	Quervernetzung von (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ mit ribosomalem Protein	62
4.3.1.	Bindung von (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ an die Ribosomen	62
4.3.2.	Nachweis der kovalenten Bindung zwischen (^{3}H)EF-Tu$_S$ und 7oS$_S$ Ribosomen	62
4.3.3.	Dissoziation des 7oS$_S$·(^{3}H)EF-Tu$_S$-Komplexes	64
4.4.	Isolierung und Identifizierung der mit EF-Tu quervernetzten ribosomalen Proteine	66
4.4.1.	Angaben über das gegen EF-Tu gerichtete Antiserum	67

Seite

4.4.2.	Radioaktive Markierung von ribosomalen 5oS ^{SH} Untereinheiten	68
4.4.3.	Affinitäts-Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu	68
4.4.4.	Affinitäts-Chromatographie von ribosomalen (^{3}H)5oS Proteinen	69
4.4.5.	Affinitäts-Chromatographie von TP (^{3}H)7oS$_S$·EF-Tu$_S$	7o
4.4.6.	Gelelektrophorese der extrahierten Proteine	71
4.4.7.	Auswertung der Ergebnisse	72
4.4.8.	Identifizierung der quervernetzten Proteine	73

III. Diskussion

1.	Grenzen der angewandten Methoden	75
1.1.	Quervernetzung	75
1.2.	Isolierung der quervernetzten Proteine	77
1.3.	Identifizierung der quervernetzten Proteine	77
2.	In der Literatur beschriebene Ergebnisse aus Quervernetzungsversuchen an ribosomalen 5oS Untereinheiten	78
3.	Angaben zu den im Komplex mit EF-Tu auftretenden quervernetzten Proteinen der 5oS Untereinheiten	61
4.	Vergleich der mit dem Quervernetzungsreagenz erhaltenen Ergebnisse mit den aus Funktionsanalysen erhaltenen Resultaten	83

IV. Zusammenfassung 85

V. Literaturverzeichnis 86

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GMP-PCP	Guanolyl-β,γ-Methylendiphosphat
MBID	Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat
DTT	Dithiotreitol
DNase	Desoxyribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
aa-tRNS	Aminoacyl-transfer-Ribonucleinsäure
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthan-sulfonsäure
TEA	Triäthanolamin
PEG	Poly-Äthylenglykoll
Poly-U	Polyuridylsäure
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
EF-T	Elongationsfaktor T
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EF-Ts	Elongationsfaktor Ts
EF-G	Elongationsfaktor G
$EF\text{-}Tu_x$ oder $5oS_x$	x = n, SH, S n = unbehandelter EF-Tu oder unbehandelte ribosomale 5oS Untereinheiten SH = MBID ist an die Lysine von EF-Tu oder 5oS gebunden. Die Lösungen werden unter reduktiven Bedingungen gehalten. S = MBID ist an die Lysine von EF-Tu oder 5oS gebunden. Die Lösungen werden unter oxydierenden Bedingungen gehalten.

$70S_{SH}$	70S Ribosomen, die aus $50S_{SH}$ und $30S_n$ in Anwesenheit von Polyuridylsäure gebildet werden und unter reduzierenden Bedingungen gehalten werden.
$70S_S$	$70S_{SH}$, die oxydiert werden.
$(^3H)70S$	70S Ribosomen, die aus $(^3H)50S$ und 30S in Anwesenheit von Polyuridylsäure gebildet werden.
TP 70	Die Gesamtheit der aus den 70S Ribosomen extrahierten Proteine
TP 50	Die Gesamtheit der aus den ribosomalen 50S Untereinheiten extrahierten Proteine
$TP(^3H)70_S \cdot EF\text{-}Tu_S$	Die Gesamtheit der aus dem $(^3H)70S_S \cdot EF\text{-}Tu_S$ Komplex extrahierten Proteine
RNP-Fragmente	Ribonukleoprotein-Fragmente
Fab	Antikörperfragmente
NIS	Nonimmunserum

I. Einleitung

Ribosomen sind spezifisch organisierte Zellorganellen, an denen die bei Pro- und Eukaryonten nach demselben Prinzip ablaufende Proteinbiosynthese stattfindet. Die Ribosomen treten frei im Zytoplasma auf oder sind an das endoplasmatische Retikulum gebunden. Außerdem sind sie in Chloroplasten und Plastiden vorhanden.

Die meisten Daten über die Struktur und Funktion von Ribosomen liegen über die von Prokaryonten vor. Sie werden auf Grund ihres Sedimentationskoeffizienten $S^{o}_{2o,w}$, der ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit im Schwerefeld der Zentrifuge darstellt, als 7oS Ribosomen bezeichnet. Ihr Molekulargewicht beträgt 2,65 x $1o^{6}$ Dalton. Bei Mg^{2+} Konzentrationen von weniger als $1o^{-3}$ M MgAc dissoziieren die Ribosomen in zwei ungleiche Untereinheiten von 3oS (MG: o,9 x $1o^{6}$ Dalton) und 5oS (MG: 1,75 x $1o^{6}$ Dalton).

Die 3oS Untereinheiten haben eine längliche Gestalt mit den Dimensionen 18o-2oo Å x 1oo Å x 8o Å (Tischendorf et al. 1975). Sie bestehen aus einem 16S RNS Molekül und 21 Proteinen, die entsprechend ihrer Wanderung in der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese mit S1 - S21 benannt werden (Übersichtsartikel: Wittmann 1976).

Die 5oS Untereinheiten erscheinen in der elektronenmikroskopischen Darstellung als "Krone" in der Aufsicht bzw. als "Nierenform" in der Seitenansicht (Wabl et al. 1973). Die Achsenlängen betragen 13o Å x 17o Å x 26o Å. Die 5oS Untereinheiten bestehen aus einem großen 23S RNS Molekül, einem kleinen 5S RNS Molekül und 34 Proteinen, die mit L1 - L34 bezeichnet werden.

Die Molekulargewichte der ribosomalen Protine betragen 6ooo - 32 ooo Dalton. Lediglich S1 stellt mit dem Molekulargewicht von 65 ooo Dalton eine Ausnahme dar. Die meisten Proteine haben einen isoelektrischen Punkt von pH 8 - 12. Von einigen Proteinen (S1, S2, S1o, L4, L8, L9, L1o) liegt der isoelektrische Punkt bei pH 5 - 8, von drei Proteinen (S6, L7, L12) im sauren Bereich bei pH 5,o.

Für etwa 5o % der in E. coli Ribosomen vorkommenden Proteine sind inzwischen die Aminosäurensequenzen ermittelt worden (Übersichtsartikel: Wittmann & Wittmann-Liebold 1974; Wittmann-Liebold und Dizionara 1976).

S2o aus der kleinen und L26 aus der großen Untereinheit weisen eine völlig identische Primärstruktur auf. L7 und L12 sind einander sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich voneinander lediglich im N-Terminus, der bei L7 (aber nicht bei L12) in acetylierter Form vorliegt (Terhorst et al. 1973). Alle übrigen ribosomalen Proteine haben voneinander völlig verschiedene Primärstrukturen.

Zur Topographie der Ribosomen, d.h. der räumlichen Anordnung von Proteinen und RNS zueinander, liegen Ergebnisse vor, die mit sehr unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden: a) Bei der totalen oder partiellen Rekonstitution der ribosomalen Untereinheiten (Traub & Nomura 1968; Maruta et al. 1971; Nierhaus & Dohme 1974) werden auf Grund der Reihenfolge des Zusammentretens von RNS und Proteinen Rückschlüsse auf ihre Anordnung in den Ribosomen gezogen. Diese Ergebnisse führten zur Aufstellung der "assembly-map" (Mizushima & Nomura 197o). b) Trypsinverdauung der Ribosomen zeigt, daß einige ribosomale Proteine gegen den Abbau durch Trypsin geschützt sind (Spitnik-Elson & Breiman 1971, Crichton & Wittmann 1971). c) Bei der Verdauung der Ribosomen mit Ribonuklease entstehen RNS-Protein-Fragmente (Übersichtsartikel: Zimmermann 1974). d) Durch die Behandlung von Ribosomen mit verschiedenen Salzkonzentrationen werden Proteine (split-Proteine) von den Ribosomen abgespalten (Homann & Nierhaus 1971; Nierhaus et al. 1973). e) Die chemischen und enzymatischen Modifizierungen an den Ribosomen, zu denen auch die in dieser Arbeit verwendete Quervernetzung gehört, geben Auskunft über die Nachbarschaftsbeziehungen von Proteinen in den Ribosomen, die Bindungsstelle von den bei der Proteinbiosynthese beteiligten Faktoren und die Bindung der Proteine an die RNS (Übersichtsartikel: Traut et al. 1974; Kurland 1974). f) Bindung von Antibiotika an die Ribosomen (Stöffler & Tischendorf 1975; Pongs et al. 1973) und Untersuchungen

mit Hilfe der Neutronenbeugungsmethode (Moore et al. 1974) liefern weitere Angaben zur Topographie der Ribosomen.
g) Behandlung der Ribosomen mit Antikörpern und elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörper-Ribosomen Komplexe (Tischendorf et al. 1975) geben eingehende Informationen über die Lokalisation von Proteinanteilen verschiedener Proteine auf der Ribosomenoberfläche.

Funktion der Ribosomen

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die gemäß der Nukleotidsequenz der Tripletts auf der mRNS miteinander in bestimmter Reihenfolge verknüpft werden. Diese Übertragung des Triplettscodes in eine bestimmte Reihenfolge von Aminosäuren (Translation) findet an den Ribosomen statt. Für die Verknüpfung werden die Aminosäuren mit Hilfe von Aminoacyl-tRNS-Synthetase an tRNS gebunden und dadurch zur Aminoacyl-tRNS (im folgenden mit "aa-tRNS" abgekürzt) aktiviert.

Die Translation besteht aus drei Phasen: Start der Proteinbiosynthese (Initiation), Kettenverlängerung (Elongation), Kettenabschluß (Termination) (Übersichtsartikel: Lucas-Lenard & Lipmann 1971; Haselkorn & Rothmann-Denes 1973; Wittmann 1976).

Jede dieser Translationsphasen besteht wieder aus mehreren Schritten. In Abb. 1 ist das gesamte Schema der Proteinbiosynthese dargestellt:

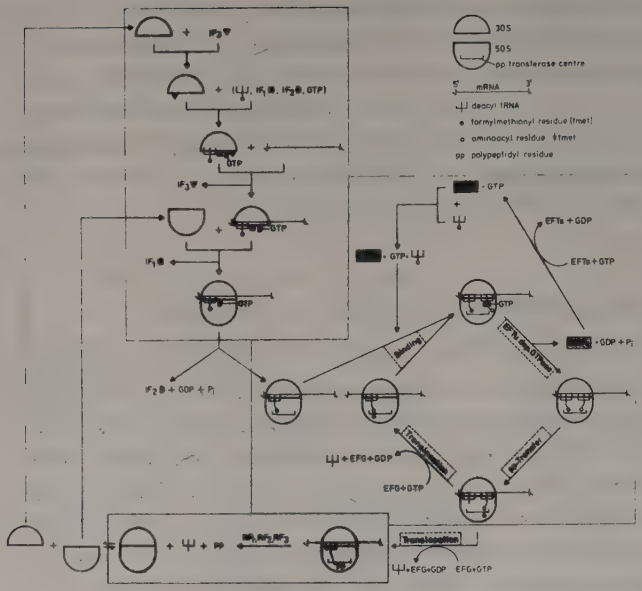


Abb. 1 Schema der Proteinbiosynthese (K. Nierhaus, persönliche Mitteilung)

Unterteilung der Proteinbiosynthese:

1) Initiation
   a) Erkennung der Initiationsfaktoren und der mRNS durch die 30S Untereinheiten
   b) Bindung von f-Met-tRNS$_F^{Met}$ an die "P-Region" der Ribosomen
   c) Anlagerung von 50S an den gebildeten Initiationskomplex

2) Elongation
   a) EF-Tu abhängige aa-tRNS Bindung an die "A-Region" der Ribosomen. Für die Reaktion sind ebenfalls EF-Ts und GTP notwendig.

b) Bildung der Peptidbindung durch die in der 5oS Untereinheit lokalisierte Peptidyltransferase. Es findet eine Reaktion zwischen der α-Aminogruppe der aa-tRNS und der Carboxylgruppe der Peptidyl-tRNS oder der N-Formylmethionin-tRNS statt. Das schon gebildete Peptid wird dabei auf die in der A-Region gebundene aa-tRNS übertragen.

c) EF-G und GTP abhängige Translokation.
Die Ribosomen rücken auf der mRNS um ein Triplett in Richtung 3' Ende weiter. Dadurch wird gleichzeitig der Peptidyl-tRNS·mRNS Komplex von der ribosomalen "A-Region" zur ribosomalen "P-Region" transportiert.

Dieser Elongationszyklus wiederholt sich so lange, bis ein sog. Terminations-Codon in die A-Region der Ribosomen tritt. Als Terminations-Codone wirken die Tripletts UAA, UAG und UGA, für die es keine entsprechenden aa-tRNS gibt.

3) Termination

Die Terminations-Codone leiten die Termination ein. Sie werden von zwei Entlassungsfaktoren RF-1 und RF-2 erkannt, die die Abspaltung des neu synthetisierten Proteins von den Ribosomen bewirken. Die Reaktion wird durch einen dritten Faktor RF-3 und GTP stimuliert. Die Abspaltung der tRNS von dem neu synthetisierten Protein wird sehr wahrscheinlich durch die Peptidyltransferase katalysiert.

Bindung von EF-Tu an die Ribosomen

Die Bindung von EF-Tu an die Ribosomen ist GTP abhängig. EF-Tu bildet mit GTP und aa-tRNS den "ternären Komplex" EF-Tu·GTP·aa-tRNS, der an die Ribosomen gebunden wird (Gordon 1967; Gordon 1968; Ravel et al. 1968; Lucas-Lenard & Haenni 1968; Skoultchi et al. 1969). Hydrolyse von GTP führt zur Abspaltung des EF-Tu von den Ribosomen und gibt dadurch die aa-tRNS für die Peptidbindung und den Transport an den Ribosomen frei (Haenni et al. 1968; Gordon 1969; Lucas-Lenard

et al. 1969; Ono et al. 1969; Shorey et al. 1969). GTP kann durch das nicht hydrolysierbare Analog GMP-PCP ersetzt werden (Haenni & Lucas-Lenard 1968; Skoultchi et al. 197o). EF-Tu bleibt dabei an die Ribosomen gebunden; die aa-tRNS kann keine Peptidbindung eingehen (Lucas-Lenard et al. 1969; Skoultchi et al. 197o). (Übersichtsartikel: Lucas-Lenard & Lipmann 1971).

Dieser EF-TU·Ribosomen Komplex kann z.B. durch Zentrifugation isoliert werden.

Die Ergebnisse über die Funktion von EF-Tu wurden zunächst durch indirekte Nachweise erbracht (Wechselwirkung von EF-Tu und GTP bzw. Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen). Erst durch Verwendung von (^{3}H)EF-Tu konnte direkt die Bindung von EF-Tu an die Ribosomen gezeigt werden (Kleinert & Richter 1975).

Unbekannt sind bisher diejenigen Proteine der 5oS Untereinheiten, an die EF-Tu während der Elongation bindet bzw. diejenigen Proteine, die sich in naher Nachbarschaft der EF-Tu Bindungsstelle befinden.

Eine Reihe von Versuchen, die im folgenden diskutiert werden, ergaben, daß die Proteine L7/L12 für die Bindung der Elongationsfaktoren Tu und G wichtig sind:

Versuche mit Antibiotika, z.B. Siomycin, Thiostrepton und Thiopeptin zeigten, daß die EF-Tu abhängige Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen und die EF-Tu bzw. EF-G abhängige GTP-Hydrolyse gehemmt wurde (Bodley & Lin 197o; Bodley et al. 197o; Tanaka et al. 197o; Weisblum & Demohn 197o a; Weiblum & Demohn 197o b; Pestka 197o; Highland et al. 1971; Kinoshita et al. 1971; Modolell et al. 1971 a; Modolell et al. 1971 b). Chloramphenicol hemmte jedoch nur die EF-G, nicht aber die EF-Tu abhängigen Reaktionen (Spirin et al. 1976).

5oS core-Partikel, denen L7/L12 fehlte, waren bei den EF-Tu und EF-G katalysierten Reaktionen inaktiv (Hamel & Nakamoto 1971; Brot et al. 1972; Hamel et al. 1972; Hamel & Nakamoto 1972; Sander et al. 1972; Sopori & Lengyel 1972; Weissbach

et al. 1972; Kischa et al. 1971). Bei 50S CsCl core-Partikeln, denen L1, L7, L8, L10, L12, L16, L25, L28, L31 und L33 fehlten, konnte die GTPase Aktivität durch einen großen molaren Überschuß an L12 wiederhergestellt werden oder durch Hinzufügen von L7 und L10 (wobei L10 für die Bindung von L7 notwendig ist (Schrier & Möller 1975)) (Schrier et al. 1973).

Versuche mit Antikörpern und Fab's zeigten, daß Anti-L7 und Anti-L12 die EF-Tu und EF-G katalysierten Reaktionen hemmten (Highland et al. 1971; Kischa et al. 1971; Highland et al. 1973; Thammana et al. 1973; Lelong et al. 1974; Stöffler 1974). Selbst Antikörper gegen Fragment 27-110 der Cyanbromid-Spaltung von L7 hemmten die Elongationsfaktor abhängigen Reaktionen (Stöffler 1974). Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, daß L7/L12 für die Bindung der Elongationsfaktoren an die Ribosomen wichtig sind.

Anti-L7/L12 hemmten, wenn auch in geringerem Maße, die nicht-enzymatische Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen (Stöffler 1974). Dies deutet auf folgende Möglichkeiten: a) durch Anti-L7/L12 wird die gesamte Struktur der Ribosomen verändert, so daß die aa-tRNS Bindungsstelle verändert wird, b) L7/L12 liegen direkt in der Bindungsstelle der aa-tRNS, c) L7/L12 liegen in sehr naher Nachbarschaft zur Bindungsstelle der aa-tRNS, so daß der relativ große Antikörper bzw. das Antikörperfragment sterisch die Bindung der aa-tRNS beeinflußt.

Antikörper gegen L4, L14 und L23 hemmten ebenfalls die beiden EF-Tu abhängigen Reaktionen (aa-tRNS-Bindung und GTP Hydrolyse) und die nicht-enzymatische Bindung von aa-tRNS (Stöffler 1974).

Möglicherweise hemmten die Antikörper gegen diese Proteine nur deshalb die Reaktion, weil L4 ein Protein der aa-tRNS Bindungsstelle ist (Stöffler 1974), L14 und L23 die Reassoziation der Untereinheiten verhindern (Highland et al. 1974; Morrison et al. 1973).

Thematik der vorliegenden Arbeit

Durch chemische Modifizierung des Ribosomen ~ EF-Tu Komplexes soll die Nachbarschaftsbeziehung des an die Ribosomen gebundenen EF-Tu zu ribosomalen Proteinen aufgeklärt werden. Die chemische Modifizierung wird mit einem bifunktionellen Reagenz durchgeführt, das benachbarte Proteinketten kovalent miteinander verbindet.

Die Methode der Verwendung von bifunktionellen Reagenzien (Wold 1967) wird seit einigen Jahren auch auf dem Gebiet der Ribosomenforschung angewendet. Auf diesem Wege wurden eine Reihe von Daten über die Nachbarschaftsbeziehungen verschiedener ribosomaler Proteine zueinander und zu einigen Faktoren gewonnen.

Dabei werden zwei verschiedene Wege benutzt:

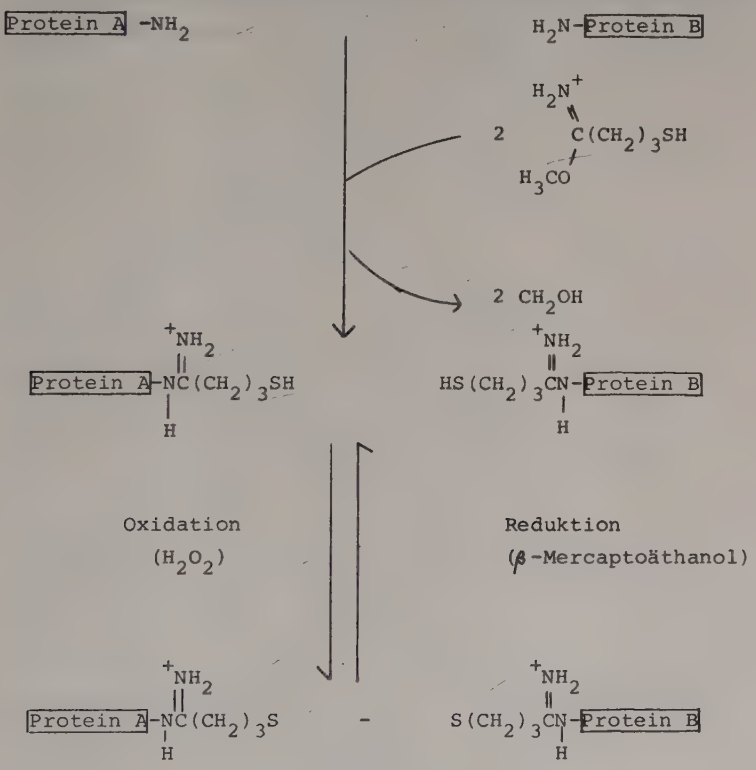
1) Bei der Verwendung von nicht spaltbaren Quervernetzungsreagenzien werden die quervernetzten Proteine im Komplex identifiziert. Dazu eignen sich gelelektrophoretische, säulenchromatographische und immunologische Methoden. Durch radioaktive Markierung der Proteine kann die Identifizierung der quervernetzten Proteine erleichtert werden.

Säulenchromatographische und gelelektrophoretische Techniken sind nur anwendbar, wenn die Ausbeute an quervernetzten Proteinen genügend hoch ist. In geringer Ausbeute auftretende Proteinkomplexe können mit Hilfe immunologischer Methoden identifiziert werden. Voraussetzung ist, daß die Antigenität der Proteine während der Quervernetzung nicht verloren geht und der quervernetzte Proteinkomplex in gereinigter Form vorliegt.

2) Bei der Verwendung von spaltbaren Quervernetzungsreagenzien wird der isolierte quervernetzte Proteinkomplex gespalten und die in ihm enthaltenen Einzelproteine identifiziert. Dazu werden immunologische und gelelektrophoretische Techniken benutzt.

Voraussetzung für die Anwendung von gelelektrophoretischen Methoden ist, daß die elektrophoretischen Eigenschaften der aus dem quervernetzten Proteinkomplex isolierten Proteine nicht verändert sind.

In dieser Arbeit wurde das spaltbare Quervernetzungsreagenz Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat verwendet. Das Reagenz reagiert mit den freien Aminogruppen der Proteine. Bei Oxidation bilden benachbarte SH-Gruppen des Reagenzes Disulfidbrücken, wodurch benachbarte Proteine kovalente Bindungen eingehen:



Nach Isolierung der quervernetzten Proteinkomplexe werden die Disulfidbrücken reduktiv gespalten. Dadurch erhält man die in den Komplexen enthaltenen Einzelproteine, die auf der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann 197o) identifiziert werden können.

Das Quervernetzungsreagenz Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat hat eine Länge von 7 Å. Damit können also auch Lysine, die einen Abstand von 14 Å haben, miteinander kovalent verbunden werden. Die Lysinreste haben eine Länge von 5 Å, so daß bei dieser Methode benachbarte Proteinketten, die voneinander einen maximalen Abstand von 24 Å haben, miteinander eine kovalente Bindung eingehen können.

II. Material und Methoden

1. Material

Der Stamm Escherichia coli CGSC 2834/a stammt vom Coli Stock Center (Yale Universität) und ist eine Revertante vom Stamm CGSC (aro E^-), die auf Minimalmedium (+ Vit. B_1) selektiert wurde.

Biogel P-15o (1oo-2oo mesh), (Bio-Rad, München)
DEAE-Sephadex A-5o (4o-12o μ), (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Sepharose 4 B (4o-19o μ), (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Guanosindiphosphat, (Boehringer, Mannheim)
Guanosintriphosphat, (Boehringer, Mannheim)
Adenosintriphosphat, (Boehringer, Mannheim)
Polyuridylsäure, (Boehringer, Mannheim)
Guanolyl-β,γ-Methylendiphosphat, (Miles, Frankfurt)
Dithiotreitol, (Aldrich Chemical Company, Inc., Steinheim/Albuch)
Desoxyribonuclease I, (Worthington / Roth, Karlsruhe)
Saccharose, (B.-D./ Schwarz-Mann, Heidelberg)
Jodacetamid (Calbiochem / Päsel, Frankfurt)
lösliche Ribonucleinsäure, (Boehringer, Mannheim)
Acrylamid, (Mitsushima Chemicals, Japan)
N,N'-Methylenbisacrylamid, (Serva, Heidelberg)
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, (Fluka AG, Buchs, Schweiz)
Natriumdodecylsulfat, (Serva, Heidelberg)
Coomassie Brillant Blau R-25o, (Serva, Heidelberg)
Aldolase, (Boehringer, Mannheim)
Cytochrom c, (B.-D. / Schwarz-Mann, Heidelberg)
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, (Boehringer, Mannheim)
Lysozym, (Boehringer, Mannheim)
Myoglobin, (Boehringer, Mannheim)
Albumin aus Hühnerei, (Boehringer, Mannheim)
Phosphorylase A, (Boehringer, Mannheim)
Rinderserumalbumin, (Serva, Heidelberg)

Na-Borhydrid(^{3}H) 6-4o Ci/mM, (Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig)

Guanosindiphosphat(^{3}H) 1,29 Ci/mM, (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain)

L-Phenylalanin-(^{14}C)(U) 46o mCi/mM, (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain)

Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat, (Pierce Eurochemie, Rotterdam)

Insta-Gel, (Packard, Frankfurt)

Soluene-1oo, (Packard, Frankfurt)

PPO, (Packard, Frankfurt)

POPOP, (Packard, Frankfurt)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Sie besaßen den jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

2. Methoden

2.1. Wachstumsbedingungen

E. coli vom Stamm CGSC 2834/a wurden bei 37°C in 1% Trypton; o,5% Hefeextrakt; o,2% Glucose gezogen und in der frühen log-Phase geerntet. Sie wurden bis zur Aufarbeitung bei -19o°C aufbewahrt.

2.2. Aufarbeitung der Zellen

(Haseltine et al. 1972)

2oo g Zellen wurden in 2oo ml Puffer 1 (1o mM Tris-HCl pH 7,8; 14 mM MgAc; 6o mM KAc; 1 mM DTT) + o,2 mg/ml DNAse aufgetaut. Mit Hilfe eines Zellhomogenisators (Typ 15 M, Gaulin Corp., USA) wurden die Zellen mit einem Druck von 3oo kg/cm^2 aufgebrochen. Das Homogenisat wurde in 2oo ml Puffer 1 aufgefangen. Um die DNAse genügend einwirken zu lassen, wurde die Lösung bei o°C 3o Min. gerührt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 3o Min. bei 3o ooo x g 4°C abgefahren. Der dabei anfallende Überstand (S-3o) enthält die Ribosomen und alle löslichen Enzyme der Zelle.

2.3.1. Präparation der ribosomalen Untereinheiten

(Haseltine et al. 1972)

Der S-3o wurde 3 Std. bei 176 ooo x g 4°C zentrifugiert. Das bei der Ultrazentrifugation sedimentierende Material enthält die 7oS Ribosomen.

Der Niederschlag wurde in Puffer 1 gelöst, auf 15o A_{26o}/ml gebracht und 36 Std. bei 4°C gegen 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM MgAc; 6 mM β-Mercaptoäthanol dialysiert.

5ooo - 6ooo A_{26o} wurden nach Hindennach et al. (1971) pro Zonalrotor (B XV Ti, MSE, England) aufgetragen, 3oS und 5oS Untereinheiten wurden durch 17 Std. Zentrifugation bei 39 ooo x g 4°C auf einem o-38%igen Saccharose-Gradienten voneinander getrennt.

Der Gradient wurde in 18 ml Fraktionen aufgefangen. Die Absorption wurde bei 29o nm gemessen.

2.3.2. Isolierung der 3oS und 5oS Untereinheiten aus der Saccharose-Lösung

Zur Isolierung der 3oS und 5oS Untereinheiten aus der Saccharose-Lösung wurden zwei verschiedene Methoden benutzt.

a) Die 3oS bzw. 5oS enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, auf 15 mM MgAc gebracht und 18 Std. bei 176 ooo x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc resuspendiert. Die 5oS Untereinheiten wurden auf 5oo A_{26o}/ml gebracht, die 3oS Untereinheiten auf 28o A_{26o}/ml.

b) Die 3oS bzw. 5oS enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, auf 1o mM MgAc gebracht und mit 1o g/1oo ml Polyäthylenglykol versetzt. Die Lösung wurde 1 Std. bei o°C gerührt und anschließend 1o Min. bei 3o ooo x g abgefahren. Der Niederschlag enthält die 3oS bzw. 5oS Untereinheiten. Er wurde in 1o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc gelöst. Die 5oS Untereinheiten wurden auf 1ooo A_{26o}/ml gebracht, die 3oS Untereinheiten auf 78o A_{26o}/ml.

2.4. Reinigung von EF-Tu

(Methode B von Arai et al. 1972)

Bei der Ribosomen-Präparation fällt nach der Ultrazentrifugation ein Überstand (S-1oo) an, der alle löslichen Enzyme der Zelle, u.a. EF-Tu und EF-G enthält. Mit dem S-1oo wurde eine Ammonsulfat-Fraktionierung durchgeführt. Das Sediment der 37-64%igen Ammonsulfat-Fraktion enthält alle die für die Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese notwendigen Enzyme. Es wurde in TM I - Puffer (2o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc); 1 mM DTT gelöst und gegen TM I - Puffer; 1 mM DTT; 14o mM KCl dialysiert.

In der Zelle liegt der EF-Tu als Komplex mit dem EF-Ts als EF-T vor. Zur Spaltung von EF-T in EF-Tu und EF-Ts

wurde die Lösung auf 3o µM GDP gebracht und 1o Min. bei 2o°C inkubiert. Im Komplex mit GDP vorliegender EF-Tu ist sehr viel stabiler als ungebunden vorliegender EF-Tu.

162o mg Protein wurden auf eine DEAE-Sephadex A 5o Säule (3 x 75 cm), die mit TM I-Puffer; 1oo mM KCl; 1o µM GDP äquilibriert war, aufgetragen. Das Protein wurde mit 5 l eines linearen Gradienten von o,1 - o,4 M KCl; TM I-Puffer; 1o µM GDP eluiert.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 18 ml/Std. Es wurden 12 ml Fraktionen gesammelt und die Extinktion in den Fraktionen bestimmt. Da EF-Ts wenige aromatische Aminosäuren besitzt, kann bei diesem Protein nicht wie bei EF-Tu und EF-G von der Absorption bei 28o nm auf den Proteingehalt geschlossen werden. Der EF-Ts Gipfel wurde bei 225 nm identifiziert.

Die Aktivität der Enzyme wurde wie unter 2.6. angegeben ausgetestet. EF-Ts und EF-Tu wurden anhand der (^{3}H)GDP Bindung identifiziert, EF-G durch seine Aktivität bei der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese.

Die EF-Ts Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit festem Ammonsulfat auf 55%ige Sättigung gebracht und 3o Min. bei o°C gerührt. Der Niederschlag wurde 1o Min. bei 3o ooo x g 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit festem Ammonsulfat auf 75%ige Sättigung gebracht und 3o Min. bei o°C gerührt. Der Niederschlag wurde 1o Min. bei 3o ooo x g 4°C abzentrifugiert und in 2o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc gelöst.

Die EF-Tu Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden ebenfalls vereinigt, mit festem Ammonsulfat auf 75%ige Sättigung gebracht, gerührt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc; 1o µM GDP resuspendiert.

Die Proteinkonzentration betrug 9,6 mg/ml.

Die EF-G Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Dialyse gegen Aquacide eingeengt.

2.5. Radioaktive Markierung von 5oS und EF-Tu

Durch reduktive Methylierung der Lysinreste wurden EF-Tu bzw. 5oS Untereinheiten unter Verwendung von (^{3}H)Na-Borhydrid und Formaldehyd radioaktiv markiert. Die Bedingungen für die radioaktive Markierung von Proteinen wurden von Means & Feeney (1968) beschrieben (s. unten). Moore & Crichton (1973) übertrugen das System auf ribosomale Untereinheiten. Sie konnten funktionell aktive 3oS, 5oS und 7oS mit einer spezifischen Radioaktivität von mehr als $1o^7$ dpm/1 A_{26o} herstellen.

2.5.1. Radioaktive Markierung von EF-Tu

(Means & Feeney 1968)

Die Inkubation wurde in einem Volumen von 1,62 ml durchgeführt:

HEPES pH 9,o	7,7	mM
MgAc	7,7	mM
GDP	7,7	µM
EF-Tu	672	µg
Formaldehyd		
(^{3}H)Na-Borhydrid	25o	mCi
(spez.Akt.: 6,3-1o,5 Ci/mM)		

EF-Tu wurde vor der Inkubation bei 4°C gegen 1o mM HEPES pH 9,o; 1o mM MgAc; 1o µM GDP dialysiert. Die Formaldehydkonzentration im Reaktionsansatz war abhängig von der Konzentration an (^{3}H)Na-Borhydrid.

Das Verhältnis Formaldehyd : (^{3}H)Na-Borhydrid betrug o,21. (^{3}H)Na-Borhydrid wurde als letzte Substanz in den Inkubationsansatz gegeben. Es wurde in 4 Portionen von je 5o µl im Abstand von je 3o Sek. hinzugefügt.

Die Inkubation betrug insgesamt 5 Min. bei o°C.

Nach der Markierung wurde die Lösung bei 4°C gegen 4 x 1 Liter 1o mM HEPES pH 9,o; 1o mM MgAc; 1o µM GDP dialysiert. und anschließend gegen 2 x 1 Liter 1o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc; 1o µM GDP.

Die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des EF-Tu erfolgte durch Fällung des Proteins, dem 1 mg Rinderserumalbanin als "Träger" zugesetzt wurde, mit 1o%iger Trichloressigsäure. Das ausgefällte Protein wurde auf Glasfiberfiltern, die mit 1o ml 1o%iger Trichloressigsäure nachgewaschen wurden, gesammelt. Die Filter wurden unter Rotlicht getrocknet und die Radioaktivität in Bray's-Szintillationslösung bestimmt.

2.5.2. Radioaktive Markierung von 5oS
(Moore & Crichton 1973)

Der Inkubationsansatz enthält in 35o µl:

TEA-HCl pH 8,o	3o mM
MgAc	9 mM
KCl	3o mM
β - Mercaptoäthanol	6 mM
$5oS_n$ oder $5oS_{SH}$	1o A_{26o}
Formaldehyd	
(^{3}H)Na-Borhydrid	1oo mCi
(spez.Akt.: 6,3-1o,5 Ci/mM)	

Die Ribosomen wurden vor der radioaktiven Markierung bei 4°C gegen 5o mM TEA-HCl pH 8,o; 15 mM MgAc; 5o mM KCl dialysiert.

Das Verhältnis von Formaldehyd zu (^{3}H)Na-Borhydrid betrug 1,o.

Formaldehyd und (^{3}H)Na-Borhydrid wurden in zwei Portionen im Abstand von 1 Min. bei o°C hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit von 1o Min. bei o°C wurde die Lösung gegen 4 x 1 Liter 5o mM TEA-HCl pH 9,o; 15 mM MgAc; 5o mM KCl dialysiert. Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität wurden die (^{3}H)$5oS_{SH}$ Untereinheiten über einen 12-3o%igen Saccharose-Gradienten zentrifugiert und die Absorption bei 26o nm und die Radioaktivität im 5oS Gipfel bestimmt.

2.6. Reaktionsansätze zur Bestimmung biologischer Aktivitäten

2.6.1. Austausch von an EF-Tu gebundenem GDP gegen (^{3}H)GDP

(Ertel et al. 1968)

In diesem Test wird (^{3}H)GDP an EF-Tu gebunden.EF-Tu kann GTP oder GDP binden. EF-Ts katalysiert diese Reaktion, indem er mit EF-Tu·GDP unter Freisetzung von GDP den EF-Tu·EF-Ts Komplex bildet. Im biologischen System wird im nächsten Schritt EF-Tu·EF-Ts gespalten. Es bildet sich EF-Tu·GTP und EF-Ts. Der EF-Tu·GDP Komplex steht nun wieder für die Bindung der aa-tRNS an das Ribosom zur Verfügung.

Bietet man in vitro statt GTP z.B. (^{3}H)GDP an, wird bei der Spaltung des EF-Tu·EF-Ts Komplexes EF-Tu·GDP und EF-Ts gebildet. Das nach der Inkubation noch vorhandene ungebundene Nukleotid wird von dem an EF-Tu gebundenen Nukleotid getrennt, indem der Reaktionsansatz über einen Millipore-Filter abgesaugt wird.

Diese Methode beruht darauf, daß hochmolekulare Bestandteile, z.B. Proteine auf dem Millipore-Filter zurückgehalten werden, während die niedermolekularen Bestandteile, wie z.B. GDP, die Poren des Filters passieren.

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten in einem Volumen von 4o µl:

Tris-HCl pH 7,5	5o mM
MgAc	1o mM
NH_4Cl	15o mM
DTT	1 mM
GDP (spez.Akt.: 1,43 Ci/mM)	2,35 µM
EF-Tu oder EF-Tu und EF-Ts	

Die Inkubationszeit betrug für EF-Tu 2o Min., für EF-Ts 1 Min. bei o°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 1o mM Tris-HCl pH 7,5; 1o mM MgAc gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Millipore-Filter der Porengröße o,45 µ abgesaugt. Der Filter wurde mit 1o mM Tris-HCl pH 7,5;

1o mM MgAc gewaschen, unter Rotlicht 2o Min. getrocknet und seine Radioaktivität in Toluol-Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

2.6.2. Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese

(Nirenberg & Matthaei 1961)

Bietet man in einem Reaktionsgemisch 7oS, Poly-U, EF-Tu, GTP und aa-tRNS an, so wird die aa-tRNS unter Bildung des ternären Komplexes aa-tRNS·EF-Tu·GTP als Zwischenprodukt an die Ribosomen gebunden. Die Translokation kann jedoch nicht stattfinden, da EF-G fehlt. Nach Zusatz von EF-G zum Reaktionsansatz wird die an die "A-Region" gebundene Peptidyl-tRNS in die "P-Region" transportiert und neue aa-tRNS kann in die "A-Region" gebunden werden. Der Elongationszyklus mit Bindung der aa-tRNS an die Ribosomen, Peptidbindung und Translokation kann ablaufen.

Nun kann man in die Reaktion aa-tRNS einsetzen, die in der Aminosäure radioaktiv markiert ist, z.B. (^{14}C)Phe-tRNS. Auf Grund der Bindung der (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen kann man indirekt die enzymatische Aktivität der Elongationsenzyme bestimmen.

Die Reaktion wurde in 1oo µl Volumen durchgeführt, in dem folgende Komponenten gelöst waren:

Tris-HCl pH 7,5	2o	mM
MgAc	1o	mM
NH_4Cl	15o	mM
DTT	1	mM
GTP	o,5	mM
5oS	o,49	µM
3oS	o,35	µM
(^{14}C)Phe-tRNS (spez.Akt.: 177-32o pMol(^{14}C)Phe/mg tRNS)		

Nach 1o-minütiger Inkubation bei 37°C wurde 1 mg Rinderserumalbumin als "Träger" hinzugegeben und die Reaktion mit 1 ml 5%iger Trichloressigsäure gestoppt.

Um überschüssige (^{14}C)Phe-tRNS zu hydrolysieren, wurde die Probe 2o Min. auf 92°C erhitzt. Das Präzipitat wurde auf Glasfiberfiltern (Schleicher & Schüll) gesammelt und mit 2o ml 5%iger Trichloressigsäure gewaschen.

Die Glasfiberfilter wurden unter Rotlicht getrocknet und anschließend in Bray's Szintillationslösung die Radioaktivität bestimmt.

2.6.3. Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen

Die enzymatische Bindung von EF-Tu wird indirekt durch die Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen nachgewiesen. Der Reaktionsansatz wird über einen Nitrocellulosefilter (Porengröße o,45 µ) filtriert. An 7oS gebundene (^{14}C)Phe-tRNS wird auf dem Filter gehalten, während ungebundene (^{14}C)Phe-tRNS die Poren des Filters passieren kann.

In einem Inkubationsansatz von 1oo µl wurden folgende Substanzen inkubiert:

	Vorinkubation	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7,8	2o mM	1o mM
MgAc	1o mM	5 mM
DTT	4 mM	2 mM
Poly-U	5 µg	2,5 µg
5oS	1,18 µM	o,59 µM
3oS	o,94 µM	o,47 µM
NH_4Cl	-	5o mM
EF-Tu		
GTP oder GMP-PCP	-	5o/4o µM
(^{14}C)Phe-tRNS (spez.Akt.: 177-32o pMol (^{14}C)Phe pro mg tRNS		

3oS und 5oS wurden mit Poly-U 1o Min. bei 3o°C vorinkubiert. Die Lösung wurde abgekühlt, die restlichen Substanzen wurden hinzugegeben und 1o Min. bei 3o°C inkubiert.

Die Reaktion wurde mit 1 ml 1o mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM MgAc; 5o mM NH_4Cl gestoppt, über einen Nitrocellulose-Filter abgesaugt und mit 1o ml des gleichen Puffers gewaschen.

Nach dem Trocknen des Filters unter Rotlicht wurde die Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit auf Toluolbasis gezählt.

2.6.4. Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen

Die oben angegebene Reaktion zur Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS wurde in 5oo µl Volumen durchgeführt. Anstelle von EF-Tu wurde (^{3}H)EF-Tu eingesetzt, der mit kaltem EF-Tu auf eine spezifische Radioaktivität von o,4 Ci/mMol verdünnt wurde. Anstelle von GTP wurde das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GMP-PCP benutzt, so daß die Abspaltung des (^{3}H)EF-Tu von den Ribosomen verhindert wurde.

2.7. Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes

2.7.1. Sedimentation des Komplexes über 5 % Saccharose

17o pMol 7oS·(^{3}H)EF-Tu wurden auf 1,6 ml 5% Saccharose in 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 15 mM MgAc; 2 mM DTT aufgetragen und 4,5 Std. bei 14o ooo x g 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5o µl 5o mM TEA-HCl pH 8,o; 15 mM MgAc; 5o mM KCl gelöst. Es wurden die Absorption bei 26o nm und die Radioaktivität bestimmt.

2.7.2. Gradientenzentrifugation zur Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes

85 pMol 3oS, 85 pMol 5oS oder 17o pMol 7oS bzw. 7oS·(^{3}H) EF-Tu wurden in 7oo µl auf 12,8 ml eines linearen Gradienten von 12% - 3o% Saccharose in 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 2o mM MgAc; o,2 mM GMP-PCP aufgetragen. Die Zentrifugation im SW 4o Rotor betrug 15 Std. bei 23 ooo UpM.

Die Gradienten wurden mit Hilfe des Isco Gradienten-Fraktionators ausgetropft und die Extinktion wurde bestimmt. Das Fraktionsvolumen betrug 35o µl. Von einem Aliquot wurde in 1o ml Insta-Gel die Radioaktivität bestimmt.

2.8. Gelelektrophoresen

2.8.1. Acrylamid-Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (Weber & Osborn 1969)

Bei dieser Elektrophorese werden die Proteine vor dem Auftragen in einer o,1% SDS-Lösung mit dem Detergens beladen. Dabei treten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Detergens und kationischen Gruppen der Proteine auf (Putnam & Neurath 1954; Oakes 1973). Zwischen den hydrophoben Gruppen der Proteine und den Kohlenwasserstoff-Ketten des Detergens treten ebenfalls Wechselwirkungen auf (Reynolds et al. 197o).

Die Gelelektrophorese wurde je nach dem Molekulargewicht der zu trennenden Proteine mit einem 8%igen bzw. 1o%igen Acrylamidgel durchgeführt.

Das Gel (o,5 x 9,5 cm) bestand aus:

8 % (1o %)	Acrylamid
o,14 % (o,27 %)	Bisacrylamid
o,1 M	Na-Phosphat pH 7,o
o,1 %	SDS
6 M	Harnstoff

Zur Polymerisation wurde das Redox-Katalysator-System Ammoniumperoxodisulfat-TEMED benutzt, 2 - 5o µg Protein wurden in 1oo µl 1o mM Na-Phosphat pH 7,o; o,1% SDS; o,1% β-Mercaptoäthanol; 6 M Harnstoff 5 Min. auf 9o°C erhitzt. Vor dem Auftragen wurde zu jeder Probe 1 Tropfen Glycerin gegeben, um die Dichte der Lösungen zu erhöhen. Außerdem wurde etwas Bromphenol-Blau hinzugegeben, das als Marker für die Pufferfront diente.

Die Laufzeit der Gele betrug 2,5 Std. bei 1,4 mA/cm (1o% Acrylamid) bzw. 2,5 Std. bei 1,4 mA/cm (8% Acrylamid); o,1 M Na-Phosphate pH 7,o; o,1% SDS.

Nach dem Lauf wurden die Gele 3o Min. in 5o% Trichloressigsäure gebracht und dann 3o Min. in einer Lösung von o,1% Coomassie Brillant Blau in 5o% Trichloressigsäure gefärbt.

In 7% Essigsäure wurden die Gele über Nacht entfärbt. Gele mit radioaktivem Material wurden nicht angefärbt. Sie wurden in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Zu jeder Scheibe wurden 2oo µl 1%ige SDS-Lösung gegeben. Das Protein wurde 12 Std. bei 37°C eluiert. Die Radioaktivität des Eluats wurde in Bray's Szintillationslösung bestimmt.

Als Eichproteine dienten folgende Substanzen:

Cytochrom c	(11 7oo Dalton)
Lysozym	(14 3oo Dalton)
Myoglobin	(17 5oo Dalton)
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	(36 ooo Dalton)
Aldolase	(4o ooo Dalton)
Ovalbumin	(46 ooo Dalton)
Rinderserumalbumin	(67 ooo Dalton)
Phosphorylase A	(94 ooo Dalton)

Trägt man den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die relative Mobilität der Proteine auf, erhält man eine Eichgerade. Die relative Mobilität (M) errechnet sich aus der Länge des Gels vor dem Färben (A), der Lösungsmittelfront (B), der Länge des Gels nach dem Färben (C) und der Proteinfront (D).

$$M = \frac{A \times D}{B \times C}$$

2.8.2. Mikro-zweidimensionale Gelelektrophorese

(I. Wool; verändert nach P. Prokoph & V. Erdmann, unveröffentlichte Ergebnisse)

Die Methode, ribosomale Proteine auf einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zu trennen, wird von Kaltschmidt & Wittmann (197o) beschrieben. I. Wool übertrug das System auf ein kleineres Format. Für die Mikro-2 D benötigt man sehr wenig Material. Schon 1oo µg TP 7o können auf der Mikro-2 D dargestellt werden. Die Trennung der Proteine auf der Mikro-2 D ist zufriedenstellend.

1. Dimension:
Abmessung der Gele: 1 mm x 5,5 cm
Trennzeit: 9o Min. bei 15o Volt

a) Untergel (5% Acrylamid)

6 M Harnstoff
5% Acrylamid
1,8% Bisacrylamid
2o mM EDTA
5o mM Borsäure
4o mM Tris
3% TEMED
o,o6% Ammoniumperoxidisulfat

b) Probengel (4% Acrylamid)

8 M Harnstoff
4% Acrylamid
2% Bisacrylamid
2,3 mM EDTA
5 mM Borsäure
1% TEMED
o,5% Ammoniumperoxidisulfat
o,o5% Riboflavin

c) Obergel (1o% Acrylamid)

6 M Harnstoff
1o% Acrylamid
3,8% Bisacrylamid
2o mM EDTA
5o mM Borsäure
4o mM Tris
3% TEMED
o,o6% Ammoniumperoxidisulfat

Elektrodenpuffer

6 M Harnstoff
6,5 mM EDTA
155 mM Borsäure
12o mM Tris

2. Dimension:
Abmessung der Gele: 7 cm x 5 cm x 1 mm
Trennzeit: 4 Std. bei 65 Volt

a) Bodengel

6 M Harnstoff
26% Acrylamid
o,64% Bisacrylamid
5% Essigsäure
o,9 M KOH
6% TEMED
o,5% Ammoniumperoxidisulfat

b) Trenngel

6 M Harnstoff
19% Acrylamid
o,48% Bisacrylamid
5,4% Essigsäure
o,9 M KOH
6% TEMED
o,3% Ammoniumperoxidisulfat

c) Elektrodenpuffer

19o mM Glycin
o,3% Essigsäure

Nach dem Lauf wurden die Gele in o,1% Coomassie Brillant Blau, 7,5% Essigsäure, Methanol 2o Min. bei 37°C gefärbt und über Nacht in 7,5% Essigsäure, 28% Methanol entfärbt. Die Proteinflecken wurden ausgestochen. Das Protein wurde mit 1 ml Soluene 3 Std. bei 4o°C eluiert und die Radioaktivität in 1o ml Bray's Szintillationslösung bestimmt.

2.8.3. Mini-zweidimensionale Gelelektrophorese
(Kaltschmidt & Wittmann 197o)

Die Mini-zweidimensionale Gelelektrophorese wurde entsprechend der zweidimensionalen Harnstoffgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann 197o durchgeführt.

Bei der ersten Dimension wurden die Proteine bei pH 8,6 nach ihrer Ladung getrennt. Die Acrylamid-Konzentration im unteren Gel betrug 5%, im oberen Gel 1o%. Bei 9,5 cm langen Gelen wurde die Elektrophorese für 24 Std. bei 6o Volt durchgeführt.

In der zweiten Dimension werden die Proteine vorwiegend nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Plattengröße betrug 1o x 1o x o,3 cm. Die Elektrophoresezeit betrug 16 Std. bei 9o Volt in Glycin-Puffer bei pH 4,6.

Nach dem Lauf wurden die Gele in 5,5 g Amidoschwarz, 55 ml Eisessig pro 1 Liter Volumen 4-5 Min. gefärbt. Nach 2-stündigem Wässern unter fließendem Wasser wurden die Platten mit 7% Essigsäure entfärbt.

Vor dem Ausstechen der Proteinflecken wurden die Platten 3o Min. unter fließendem Wasser gewässert.

Die Gelstückchen wurden mit 2 ml Soluene 12 Std. bei 4o°C eluiert und die Radioaktivität in 1o ml Insta-Gel bestimmt.

2.9. Präparation der Aminoacyl-Synthetase-Enzyme aus E.-coli

5o g E.coli A 19 Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden mit dem doppelten Volumen Aluminiumoxid (Alcoa - 3o1) in einem bei -2o°C vorgekühlten Mörser gerieben, bis ein flüssiger Brei entstand. Der Brei wurde im 2,5 fachen Volumen 1o mM Tris-HCl pH 8,o; 1o mM MgAc; 1o% Glycerin; 1 mM DTT aufgenommen.

Die Zelltrümmer wurden 1o Min. bei 3o ooo x g 4°C abzentrifugiert, das Sediment wurde mit 125 ml des gleichen Puffers

gewaschen und 1o Min. bei 3o ooo x g 4°C rezentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und die darin enthaltenen Ribosomen 2 Std. bei 4o ooo UpM im 6o Ti bei 4°C abgefahren. Der S-1oo wurde auf 7o% Ammonsulfat gebracht, 2o Min. bei o°C gerührt und 1o Min. bei 3o ooo x g 4°C abzentrifugiert. Das Sediment enthält die Aminoacyl-Synthetase-Enzyme. Es wurde in 1o ml 1o mM Tris-HCl pH 8,o; 1o mM MgAc; 1 mM DTT; 1o % Glycerin gelöst und über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert.

2.1o. Präparation von (^{14}C)Phe-tRNS

(Conway 1964)

Die tRNS lag als Gemisch der in den Zellen auftretenden tRNS-Arten vor. Die darin enthaltene $tRNS^{Phe}$ wurde mit (^{14}C)Phenylalanin beladen. Die tRNS wurde, bevor sie in die Reaktion eingesetzt wurde, 12 Std. gegen 4 mM KAc pH 5,2; 1 mM EDTA dialysiert.

Die Reaktion zur Aminoacylierung der tRNS wurde in einem Volumen von 1oo ml ausgeführt.

K-Phosphat, pH 7,2	1oo mM
$MgCl_2$	1o mM
KCl	1o mM
ATP	2 mM
(^{14}C)Phenylalanin (spez. Akt.: 466 mCi/mM; neutralisiert mit 1 M KOH)	2,6 µM
Aminoacyl-Synthetase-Enzyme aus E. coli	5 mg
tRNS aus E. coli	61,6 µM

Das Reaktionsgemisch wurde 3o Min. bei 37°C geschüttelt. Nach der Inkubation wurde das gleiche Volumen (1oo ml) 88% Phenol hinzugegeben und die Lösung 15 Min. auf dem Vortex bei 25°C geschüttelt. Durch Zentrifugation bei 3o ooo x g (2o Mind., 25°C) trennten sich die beiden Lösungsmittel in zwei Schichten.

Die wäßrige Phase, in der die tRNS gelöst ist, bildete die obere Schicht. Sie wurde abgehoben, mit o,1 Volumen 2o% KAc pH 5,2 und 2,5 fachem Volumen 96% Äthanol versetzt und über Nacht bei -2o°C stehengelassen. Die flockig ausfallende tRNS wurde abzentrifugiert (1o Min., 3o ooo x g 4°C). Der Niederschlag wurde in 2 mM KAc pH 5,2; 1 mM EDTA gelöst und 12 Std. gegen 2 mM KAc pH 5,2; 1 mM EDTA dialysiert. Anschließend wurde noch 6 Std. gegen 2 mM KAc pH 5,2 dialysiert, um das EDTA zu entfernen. Die aa-tRNS wurde bei -2o°C aufbewahrt.

Die Beladung der tRNS mit (^{14}C)Phenylalanin betrug 177-32o mMol (^{14}C)Phe/mg tRNS.

2.11. Quervernetzung von Protein mit Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat

(Traut et al. 1973)

Die Quervernetzung von Protein mit MBID besteht aus zwei Schritten:

1) Bindung von MBID an die Lysinreste von Proteinen
2) Oxidation der freien - SH Gruppen des MBID. Dabei werden zwischen benachbarten Proteinen kovalente Bindungen (R_1-S-S-R_2) geschaffen, die mit β-Mercaptoäthanol gespalten werden können.

2.11.1. Quervernetzung von Aldolase

Folgende Substanzen wurden in 1 ml Volumen 2o Min. bei o°C zur Reaktion gebracht:

Aldolase	3 mg
TEA-HCl pH 8,o	5o mM
MgAc	5 mM
KCl	5o mM
β -Mercaptoäthanol	3 %
MBID	1o mM

Um überschüssiges MBID und β-Mercaptoäthanol zu entfernen, wurde die Lösung gegen 2 x 2 Liter 5o mM TEA-HCl pH 8,o; 5 mM MgAc; 5o mM KCl dialysiert ($\rightarrow Aldolase_{SH}$).

Zur Oxidation freier -SH Gruppen wurde die Lösung auf 4o mM H_2O_2 gebracht und 3o Min. bei o°C inkubiert. Überschüssiges H_2O_2 wurde wiederum durch Dialyse entfernt ($\rightarrow Aldolase_S$).

Zur Spaltung der Disulfidbrücken wurde die Probe auf 3% β-Mercaptoäthanol gebracht und 3o Min. bei o°C inkubiert ($\rightarrow Aldolase_{SH}$).

2.11.2. Quervernetzung von ribosomalen 5oS Untereinheiten

Die Reaktion wurde wie bei der Aldolase durchgeführt. Es wurden 3 mg/ml 5oS Untereinheiten in 2 mM MBID zur Reaktion gebracht ($\rightarrow 5oS_{SH}$).

2.11.3. Quervernetzung von EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu

Die Reaktion wurde wie bei der Aldolase durchgeführt. In 1 ml Volumen wurden 365 µg EF-Tu oder 365 µg (^{3}H)EF-Tu und 5,5 mg Rinderserumalbumin in 1o mM MBID inkubiert. ($EF\text{-}Tu_{SH}$ bzw. $(^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$).

$5oS_{SH}$, $EF\text{-}Tu_{SH}$ und $(^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$ wurden in den Test zur Bindung von EF-Tu an die Ribosomen eingesetzt und nach Bildung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes ($7oS_{SH}\cdot(^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$) mit Wasserstoffperoxid oxidiert.

2.12. Salzwaschung von Ribosomen

Durch Behandlung von Ribosomen mit 1 M NH_4Cl wird nicht kovalent gebundener EF-Tu von den Ribosomen abgewaschen. Zu 5oo µl Probenvolumen (1-1o A_{26o} 7oS·EF-Tu) wurden 17o µl einer 4 M NH_4Cl-Lösung gegeben. Nach der 2o minütigen Inkubation bei o°C wurden die Proben gegen 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 2o mM MgAc dialysiert oder sofort auf einen 12-3o%igen Saccharose-Gradienten aufgetragen.

2.13. Extraktion von ribosomalen Proteinen
(Hardy et al., 1969)

Die ribosomalen Proteine wurden mit 67%iger Essigsäure bei hoher Mg^{2+} Konzentration extrahiert. Zu einem Volumen Ribosomen wurde das doppelte Volumen 1oo%iger Essigsäure gegeben. Die Lösung wurde auf o,2 M MgAc gebracht und 3o Min. bei o°C gerührt. Der Niederschlag wurde 5 Min.bei 3o ooo x g 4°C abzentrifugiert und zweimal mit 67%iger Essigsäure gewaschen.

Der Überstand wurde stufenweise gegen 2o%, 1o% und 2% Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert.

2.14.1. Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu über Biogel P-15o

11 µg (^{3}H)EF-Tu_n, (^{3}H)EF-Tu_S oder (^{3}H)EF-Tu_{SH} (spezifische Radioaktivität o,8 Ci/mM) wurden auf eine Biogel P-15o Säule (o,8 x 3o cm), die mit 5o mM Tris-HCl pH 8,2; o,5 M LiCl; 1% Rinderserumalbumin äquilibriert war, aufgetragen. Das Protein wurde mit 5o mM Tris-HCl pH 8,2; o,5 M LiCl; 1% Rinderserumalbumin eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 3 ml/Std., das Fraktionsvolumen betrug 15o µl.

Von einem Aliquot jeder Fraktion wurde die Radioaktivität in Bray's Szintillationsflüssigkeit bestimmt.

2.14.2. Affinitäts-Chromatographie

2.14.2.1. Anreicherung von Globulinen

5,5 ml Immunserum bzw. 9,6 ml Nonimmunserum wurden mit 3 ml (bzw. 5,3 ml) gesättigter, auf pH 8,2 eingestellter Ammoniumsulfatlösung versetzt und 2 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Protein wurde bei Raumtemperatur 15 Min. bei 3o ooo x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1oo mM Tris-HCl pH 8,o; 2oo mM NaCl gelöst und gegen diesen Puffer dialysiert.

2.14.2.2. Proteinkupplung an Sepharose

(March et al., 1974)

Zu 5o ml gewaschener Sepharose 4 B wurden portionsweise 45 g fein zermörsertes Bromcyan hinzugegeben. Mit 5 N NaOH wurde ein pH-Wert von 11 eingestellt. Während der 2o minütigen Inkubation bei o°C wurde der pH-Wert konstant gehalten.

Überschüssiges Bromcyan wurde auf einer Fritte mit 2-3 Liter 5o mM K_2PO_4, pH 6,5, gewaschen. Die aktivierte Sepharose wurde mit 2 mg Globulin/1 ml Sepharose 16 Std. bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde dabei leicht geschüttelt. Nicht gebundenes Protein wurde mit 5o mM K_2PO_4 pH 6,5 herausgewaschen.

Zur Absättigung eventuell noch vorhandener freier Bindungsstellen wurde die mit Protein beladene Sepharose in die Säule gefüllt und mit mindestens 1o Säulenvolumen 5o mM Tris pH 7,8; o,2% Rinderserumalbumin äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit 5o mM Tris-HCl, pH 7,8, gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 28o nm kleiner oder gleich o,o2 war.

2.14.2.3. Affinitäts-Chromatographie

(Cuatrecasas & Anfinsen 1971)

Es wurden zwei Säulen (o,8 x 8 cm) vorbereitet:

a) Sepharose, an die Globuline des Anti-Tu-Serums gekuppelt wurden,
b) Sepharose, an die Globuline des Nonimmunserums gekuppelt wurden.

Die Säulen wurden mit dem Ligandenpuffer (2o mM Tris-HCl pH 7,8; 1 M LiCl; 1,2 M Harnstoff) äquilibriert.

Anschließend wurden pro Säule 21 µg (^{3}H)EF-Tu (spezifische Radioaktivität o,4 Ci/mM) oder 3oo µg TP $7o_S$·(^{3}H) $EF\text{-}Tu_S$ + 1oo µg TP 5o als "Träger" oder 3oo µg TP (^{3}H)5oS (spezi-

fische Radioaktivität 14 Ci/mM) aufgetragen.

Das nicht an die Globuline gebundene Protein wurde mehrmals auf die Säule aufgetragen und mit den an die Säule gebundenen Globulinen 2 Std. bei 4°C inkubiert. Ungebundenes Material wurde mit dem Ligandenpuffer eluiert. Unspezifisch gebundenes Material wurde mit 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 1 M LiCl; 6 M Harnstoff eluiert. Spezifisch gebundenes Material wurde mit 8 M Harnstoff pH 2,o eluiert. Der Antikörper-Antigen-Kmplex wurde 3o Min. mit 8 M Harnstoff pH 2,o inkubiert und anschließend das Antigen (EF-Tu) mit 8 M Harnstoff pH 2,o eluiert.

Ein Aliquot von jeder Probe wurde zur Radioaktivitätsmessung in 1o ml Insta-Gel verwendet.

III. Ergebnisse

1.1. Reinigung von EF-Tu

Um die Quervernetzung zwischen ribosomalem Protein und EF-Tu durchführen zu können, war es zunächst erforderlich, sauberen EF-Tu zu isolieren.

Von verschiedenen Autoren werden Wege für die Reinigung der Elongationsfaktoren aus Bakterien beschrieben (Parmeggiani et al. 1968; Nishizuka et al. 1968; Gordon et al. 1971; Arai et al. 1972).

Die Reinigung von EF-T und und EF-G bereitet keine großen Schwierigkeiten, während die Spaltung von EF-T in EF-Tu und EF-Ts und die Isolierung von EF-Tu schwieriger ist.

Nishizuka et al. (1968) und Gordon et al. (1971) konnten keinen reinen EF-Tu isolieren; er war mit EF-Ts verunreinigt.

Eine Methode zur Isolierung von EF-Tu, die sich wegen der zu geringen Ausbeute jedoch nicht eignet, beschrieben Gordon et al. (1971). Sie isolierten den während der Elongation an die Ribosomen gebundenen EF-Tu, indem sie die Ribosomén mit hohen Salzkonzentrationen wuschen.

Parmeggiani et al. (1968) isolierten aus dem S-3o-Überstand sauberen EF-Tu. Die Ausbeute schwankte zwischen 2%-12%. Diese Methode ist allerdings sehr zeitraubend.

Arai et al. (1972) beschreiben eine Methode, EF-Tu in genügender Menge auf einem relativ schnellen Weg zu präparieren. Mit dem S-1oo-Überstand führten sie eine Ammonsulfat-Fraktionierung durch. Das dabei erhaltene Proteingemisch inkubierten sie mit Guanosindiphosphat. Dabei wurde EF-T in EF-Tu·GDP und EF-Ts gespalten. Im Komplex mit GDP vorliegender EF-Tu war bei weitem stabiler als freier EF-Tu und konnte über eine DEAE-Sephadex A-5o Säule von EF-Ts und EF-G getrennt werden. Die im EF-Tu Gipfel noch vorhandenen Verunreinigungen entfernten Arai et al. (1972) durch Chromatographie über eine Sephadex G-1oo Säule.

Für die Isolierung von EF-Tu benutzte ich die von Arai et al. (1972) entwickelte Methode. EF-T wurde vor dem Auftragen auf die

DEAE-Sephadex A-5o Säule mit Guanosindiphosphat in EF-Tu und EF-Ts gespalten. Von der DEAE-Sephadex A-5o Säule konnten EF-Tu, EF-Ts und EF-G mit einem linearen Gradienten von o,1-o,4 M KCl eluiert werden. EF-Ts wurde mit o,19 M KCl, EF-Tu mit o,2 M KCl und EF-G mit o,28 M KCl eluiert (Abb. 2).

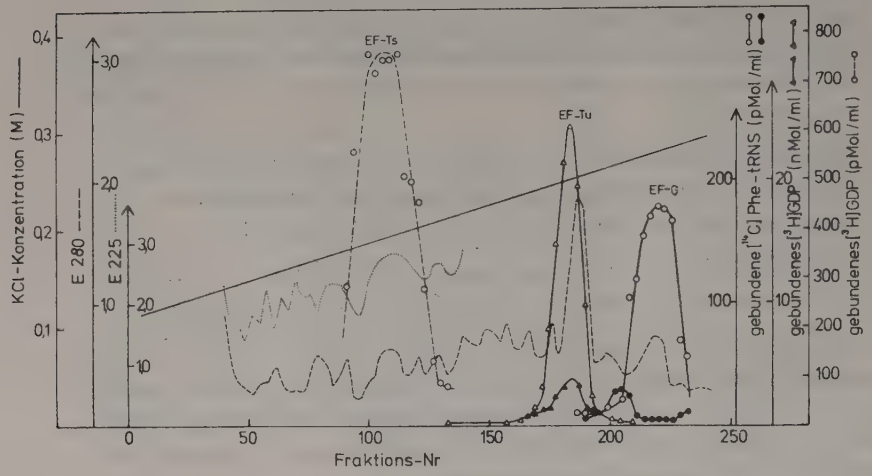


Abb. 2 DEAE-Sephadex A-5o Säulenchromatographie der Elongationsfaktoren

Die Ammonsulfatfraktion des S-1oo wurde mit GDP inkubiert, um EF-T in EF-Tu und EF-Ts zu spalten. 162o mg Protein wurden auf die Säule (3 x 75 cm) aufgetragen. Die Proteine wurden mit 5 l eines linearen Gradienten von o,1-o,4 M KCl eluiert. Die Proteingipfel wurden auf EF-Tu, EF-Ts und EF-G Aktivität getestet.

Bindung von (^{3}H)GDP: o----o Die Inkubation beträgt 1 Min. bei o°C unter Zusatz von EF-Tu; Δ———Δ Die Inkubation beträgt 2o Min. bei o°C; ▲———▲ Die Inkubation beträgt 1 Min. bei o°C ohne EF-Ts. O———O Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese in Anwesenheit von EF-Tu und EF-Ts. ●———● Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin-Synthese in Abwesenheit

von EF-Tu und EF-Ts. ..... Absorption bei 225 nm; ----- Absorption bei 28o nm; ——— KCl Konzentration im Gradienten.

1.2 Überprüfung der Reinigungsschritte

Abb. 3 zeigt die von jedem Reinigungsschritt angefertigten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen.

Nach der DEAE-Sephadex A-5o Chromatographie waren die EF-Ts und EF-G Gipfel noch stark mit anderen Proteinen verunreinigt, während im EF-Tu Gipfel nur ein einziges Protein nachgewiesen wurde.

1 2 3 4 5

Abb. 3 SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (1o% Acrylamid) von den Reinigungsschritten der Elongationsfaktoren:

1) 7o µg S-1oo 2) 7o µg Ammonsulfatfraktion des S-1oo
3) 12 µg EF-Tu (Fraktion 175 bis 183
4) 3o µg EF-Ts (Fraktion 92 bis 12o)
5) 3o µg EF-G (Fraktion 2o8 bis 222)

1.3. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht des EF-Tu wurde auf einem 1o%igen SDS-Polyacrylamid-Gel bestimmt (Abb. 4). EF-Tu besaß eine fast gleiche Mobilität wie Ovalbumin (46 ooo Dalton). Sein Molekulargewicht betrug 45 ooo Dalton $\pm$ 3%.

Arai et al. (1973) bestimmten das Molekulargewicht des EF-Tu mit Hilfe der Sedimentationsmethode und der SDS-Polyacralamid-Gelelektrophorese und erhielten 47 ooo Dalton.

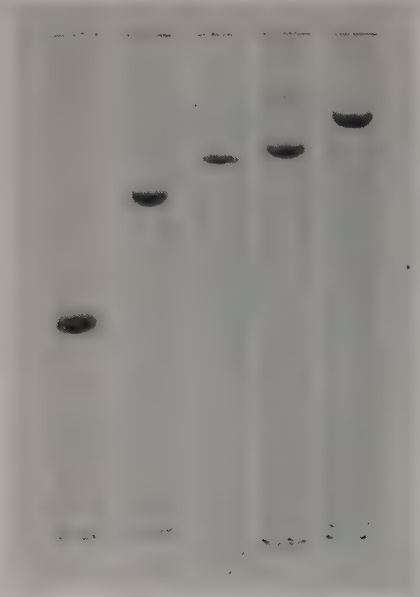


Abb. 4 Molekulargewichtsbestimmung von EF-Tu auf einem 1o%igen SDS-Polyacrylamid-Gel:

1) 1o µg Lysozym (14 3oo Dalton) 2) 1o µg Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36 ooo Dalton)
3) 12 µg EF-Tu 4) 1o µg Albumin aus Hühnerei (46 ooo Dalton) 5) 1o µg Rinderserumalbumin (67 ooo Dalton)

1.4 Aktivität von EF-Tu bei der Bindung von (^{3}H)GDP

Zunächst wurde die Aktivität des EF-Tu in einer Teilreaktion, der Fähigkeit zur Bindung von (^{3}H)GDP, ausgetestet. In Abb. 5 ist die Bindung von (^{3}H)GDP an EF-Tu dargestellt. Während einer Inkubationszeit von 2o Min. bei o°C konnten 164 mMol (^{3}H)GDP/Mol EF-Tu gebunden werden.

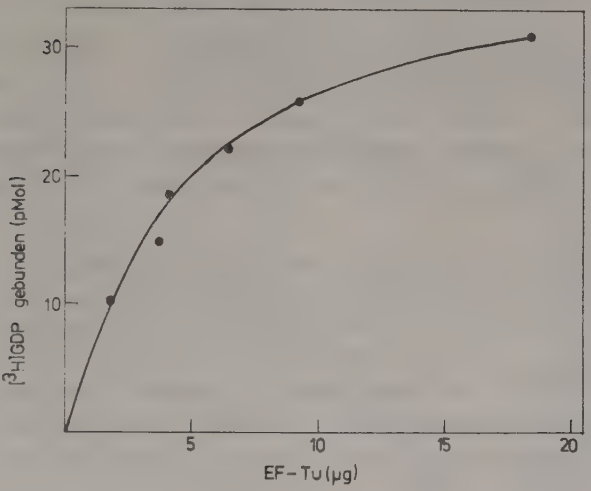


Abb. 5 Bindung von (^{3}H)GDP an EF-Tu

Die Inkubationszeit betrug 2o Min. bei o°C. Es wurde kein EF-Ts zum Inkubationsansatz gegeben.

1.5. Aktivität von EF-Tu in der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese

Das hochgereinigte Enzym EF-Tu wurde im Translationssystem mit einem künstlichen "messenger" ausgetestet. EF-Ts und EF-G wurden in verunreinigter Form zum Reaktionsansatz gegeben. Es wurden die EF-Ts bzw. EF-G Fraktionen von der DEAE-Sephadex A-5o Säulenchromatographie verwendet.

Es wurden 3oo mMol (^{14}C)Phe-tRNS pro Mol in den Test eingesetzter Ribosomen gebunden (Abb. 6).

EF-Tu war noch nach seiner Reinigung imstande, seine gesamte biologische Funktion zu erfüllen.

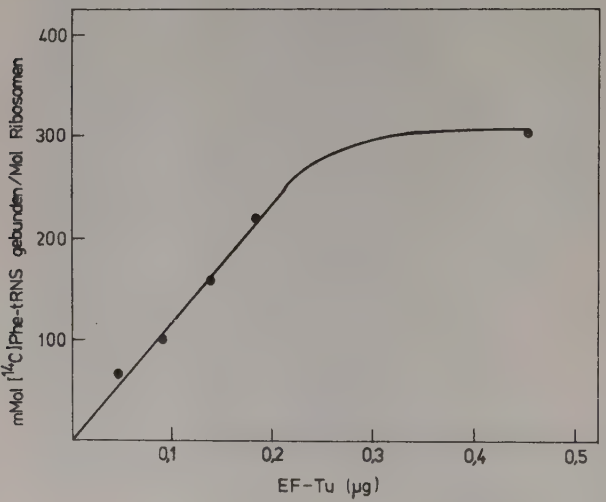


Abb. 6 Aktivität von EF-Tu in der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese

2.1. Radioaktive Markierung von EF-Tu

Die Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS ist ein indirekter Nachweis der biologischen Aktivität des EF-Tu. Mit Hilfe von radioaktivem EF-Tu kann direkt die Bindung des Elongationsfaktors an die Ribosomen nachgewiesen werden, indem der Ribosomen·EF-Tu Komplex isoliert wird. Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurden verschiedene Methoden entwickelt. Bei der am häufigsten benutzten Methode läßt man Zellen in einem Nährmedium aufwachsen, dem radioaktive Aminosäuren zugesetzt werden.

Mit Hilfe von Methoden, bei denen die Proteine durch Modifikationen der Aminogruppen radioaktiv markiert werden, kann eine höhere spezifische Radioaktivität erreicht werden. Dazu wurden bisher drei Methoden entwickelt: Methylierung (Means & Feeney 1968), Amidinierung (Hunter & Ludwig 1962) und Guanidinierung (Schütte 1943).

Die beiden letzten Methoden haben den Nachteil, daß nur bei sehr stabilen Proteinen eine ausreichend hohe Markierung zu erwarten ist. Die Methylierungsreaktion läuft unter sehr milden Bedingungen ab und kann somit für alle Proteine verwendet werden. Die Methylierungsmethode beruht auf einer stark pH-abhängigen reduktiven Methylierung der Lysinreste von Proteinen, wobei ε -N-Methyl-Lysin und ε -N-Dimethyl-Lysin entstehen. Das Hauptprodukt ist ε -N-Dimethyl-Lysin (Means & Feeney 1968). Die Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Proteine durch die Methylierung ist gering.

Die Methylierung der Proteine kann entweder mit (^{14}C)Formaldehyd und kaltem Borhydrid oder mit kaltem Formaldehyd und (^{3}H)Borhydrid durchgeführt werden.

Da radioaktives Borhydrid mit einer höheren spezifischen Markierung als Formaldehyd geliefert wird und dadurch eine höhere spezifische Radioaktivität der Proteine erreicht werden kann, führte ich die Reaktion mit (^{3}H)Borhydrid und kaltem Formaldehyd durch.

2.1.1. Reaktionsbedingungen für die radioaktive Markierung von EF-Tu

2.1.1.1. Abhängigkeit der Aktivität von EF-Tu vom Puffer und vom pH-Wert

Die Methylierungsreaktion ist sehr abhängig vom pH-Wert. Bei pH 7,o läuft die Reaktion sehr langsam ab. Ihr Optimum liegt bei pH 1o oder darüber. Means & Feeney (1968) führten die Reaktion in Boratpuffer bei pH 9,o durch. EF-Tu war in Borat-Puffer inaktiv. Puffer mit primären oder sekundären Aminogruppen sind für die Methylierung unbrauchbar, so daß Tris-Puffer, pH 9,o, in dem EF-Tu keinen Aktivitätsverlust zeigte, nicht benutzt werden konnte.

Ein weiterer aminogruppenfreier Puffer ist HEPES-Puffer. In HEPES-Puffer bei pH 8,o, pH 8,5 bzw. pH 9,o ist EF-Tu aktiv. Seine spezifische Aktivität bei der Bindung von (^{3}H)GDP beträgt 164 mMol (^{3}H)GDP/Mol EF-Tu. Dies entspricht 1oo% der in Tris-HCl, pH 7,5, gemessenen Aktivität (Abb. 7).

Bei der Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen blieb die Aktivität von EF-Tu in HEPES bis pH 9,o ebenfalls zu 1oo% erhalten. Es wurden 1oo mM (^{14}C)Phe-tRNS pro 1 Mol in den Test eingesetzter Ribosomen gebunden.

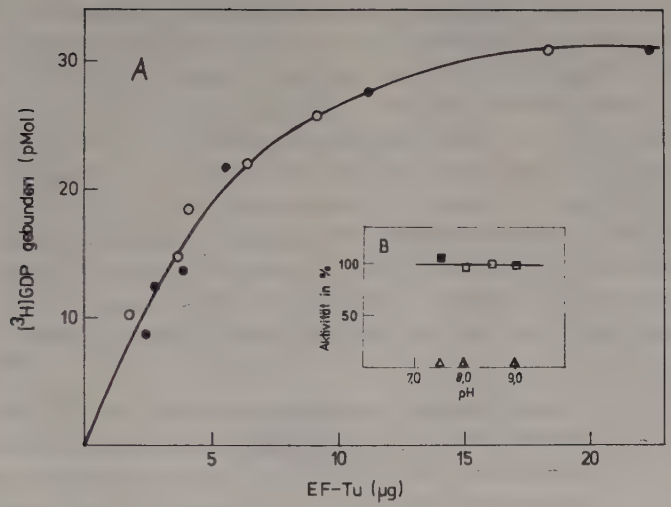


Abb. 7 Enzymatische Aktivität von EF-Tu in Tris-HCl-, Borat- und HEPES-Puffer in Abhängigkeit vom pH

A) EF-Tu lag vor in: Tris-HCl pH 7,5 ●——● ;
Tris-HCl pH 9,0 ○——○ ;
B) EF-Tu lag vor in: Tris-HCl ■——■ ;
HEPES □——□ ;
Boratpuffer △——△ .

Die Aktivität von EF-Tu wurde durch die Bindung von (^{3}H)GDP bestimmt.

2.1.1.2. Abhängigkeit der Aktivität des EF-Tu von der Formaldehyd- und (^{3}H)Borhydrid-Konzentration

Die Inkubation von EF-Tu mit steigenden Mengen von Formaldehyd hatte, solange kein (^{3}H)Borhydrid zur Reaktion hinzugegeben wurde, keinen Einfluß auf seine Aktivität bei der Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen (Nitrocellulosefilter-Methode).

Wurde eine konstante Menge (^{3}H)Borhydrid und steigende Mengen Formaldehyd mit EF-Tu zur Reaktion gebracht, so verlor

der Elongationsfaktor seine enzymatische Aktivität. Dabei war das molare Verhältnis von Formaldehyd zu Borhydrid von entscheidender Bedeutung. Bis zu einem Verhältnis Formaldehyd zu Borhydrid von o,21 besaß der Elongationsfaktor die volle enzymatische Aktivität. Überstieg der Verhältnisfaktor den Wert o,21, so wurde ein starker Abfall der enzymatischen Aktivität nachgewiesen. Bei einem Verhältnis Formaldehyd zu Borhydrid von o,5 band der Elongationsfaktor keine (^{14}C)PhetRNS mehr an die Ribosomen. Das Optimum der spezifischen Radioaktivität (17 Ci/mMol EF-Tu) wurde bei einem Verhältnis Formaldehyd zu Borhydrid von o,79 gefunden (Abb. 8). Der Elongationsfaktor war bei diesem Verhältniswert jedoch inaktiv.

Für die weiteren Versuche wurde die reduktive Methylierung mit 3 mM Formaldehyd und 14 mM (^{3}H)Borhydrid durchgeführt. Dies entspricht einem Verhältnis von Formaldehyd zu Borhydrid von o,21. Der Elongationsfaktor besaß nach der Markierung seine volle enzymatische Aktivität. Die spezifische Radioaktivität von (^{3}H)EF-Tu betrug 5-1o Ci/mM, je nach der spezifischen Radioaktivität des verwendeten (^{3}H)Borhydrids.

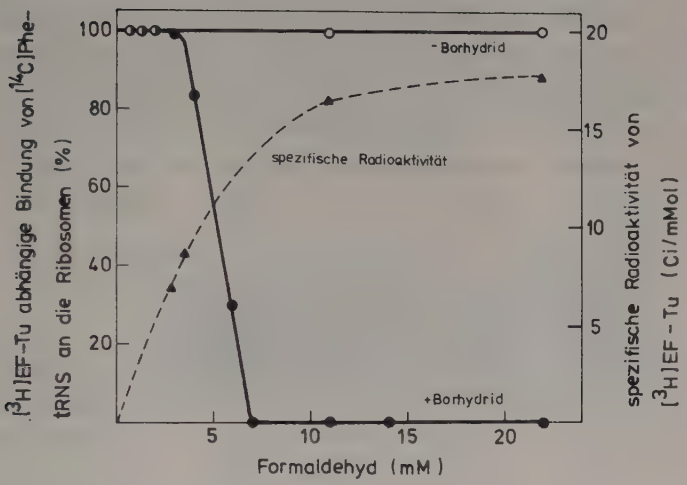


Abb. 8 Reduktive Methylierung von EF-Tu in Abhängigkeit von der Formaldehyd-Konzentration

672 µg EF-Tu wurden mit verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen in Abwesenheit und Gegenwart von (^{3}H)Borhydrid inkubiert.

Die enzymatische Aktivität wurde anhand der EF-Tu abhängigen Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen (Nitrocellulosefilter-Methode) und in der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese bestimmt.

○——○ Reaktionsansatz wie zur reduktiven Methylierung, jedoch in Abwesenheit von (^{3}H)Borhydrid;

●——● Ansatz zur reduktiven Methylierung in Gegenwart von 14 mM (^{3}H)Borhydrid;

▲- - - -▲ spezifische Radioaktivität von (^{3}H)EF-Tu in Ci/mMol.

2.2. Elektrophoretische Eigenschaften des radioaktiv markierten EF-Tu

(^{3}H)EF-Tu wurde auf einem 1o%igen SDS-Acrylamid-Gel analysiert. Radioaktivität wurde in einem einzigen Gipfel nachgewiesen, der der Proteinbande von (^{3}H)EF-Tu entsprach (Abb. 9). Die elektrophoretischen Eigenschaften des Elongationsfaktors wurden durch die reduktive Methylierung nicht verändert.

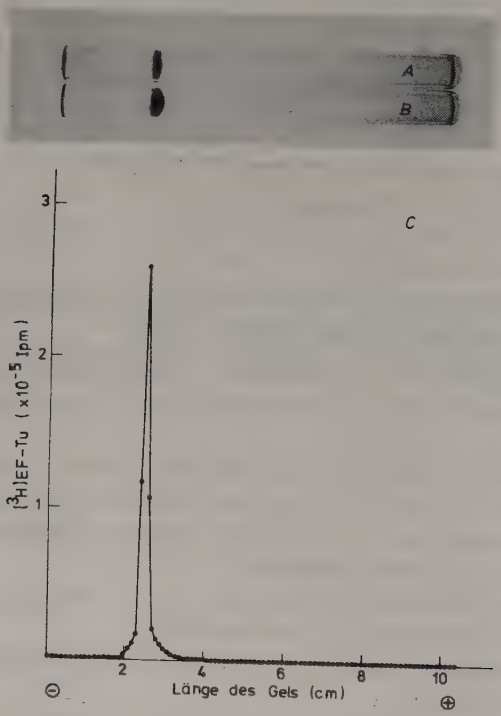


Abb. 9 Vergleich der elektrophoretischen Eigenschaften von radioaktiv markiertem und unmarkiertem EF-Tu

Auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (1o% Polyacrylamid) wurden 12 µg EF-Tu (Gel A) bzw. 12 µg (^{3}H)EF-Tu (Gel B und Gel C)

aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Gele A und B mit Comassie brillant blue angefärbt. Gel C wurde in 1 mm dicke Scheiben geschnitten, aus denen das radioaktive Protein mit 1% SDS eluiert wurde. Anschließend wurde die Radioaktivität des Eluats in Bray's Szintillationslösung bestimmt.

3. Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen und Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes

3.1. Optimierung des Testansatzes

Als Vorbereitung zu Versuchen über die Bindung von radioaktiv markiertem EF-Tu an die Ribosomen wurde der Test zur Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen durchgeführt.

EF-Tu bildet mit aa-tRNS und GTP den ternären Komplex EF-Tu·aa-tRNS·GTP, der an die Ribosomen gebunden wird. Bei der Hydrolyse von GTP dissoziiert EF-Tu von den Ribosomen. Die aa-tRNS bleibt an den Ribosomen gebunden (Übersichtsartikel: Lucas-Lenard & Lipmann 1971). Anhand der Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS kann so indirekt die Aktivität des EF-Tu bestimmt werden.

Die Optimierung des Testsystems wurde soweit wie möglich mit unmarkiertem EF-Tu durchgeführt.

3.1.1. Wirkung der Mg^{2+} Konzentration

Bei hohen Mg^{2+} Konzentrationen erfolgte schon in Abwesenheit von EF-Tu eine Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen. Es wurde die Mg^{2+} Konzentration bestimmt, bei der die nicht-enzymatische Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen möglichst gering, die EF-Tu abhängige Bindung jedoch möglichst groß war. Am günstigsten erwies sich eine Konzentration von 1o mM Mg^{2+} (Abb. 1o). Die nicht-enzymatische Bindung war bei 1o mM Mg^{2+} fast Null, während bei der EF-Tu abhängigen Bindung von

aa-tRNS an die Ribosomen 1,4 pMol (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen gebunden wurden.

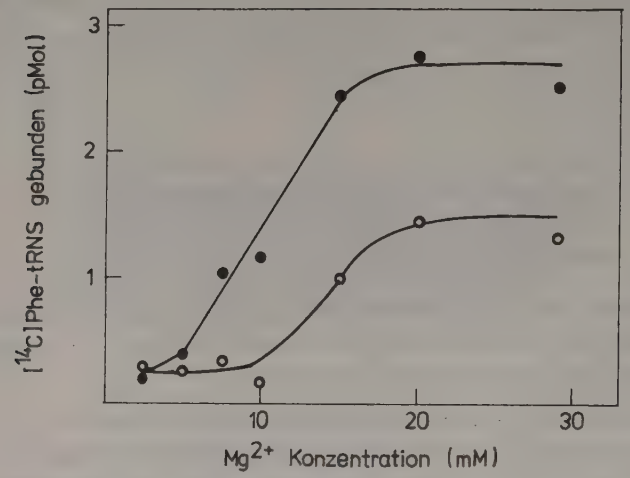


Abb. 1o Enzymatische und nicht-enzymatische Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen in Abhängigkeit von der Mg^{2+} Konzentration

o——o Nicht-enzymatische Bindung;
●——● EF-Tu abhängige Bindung.

In jeder Probe wurden 17,8 pMol Ribosomen eingesetzt.

3.1.2. Bestimmung der optimalen Ribosomenkonzentration

Es wurden zwei verschiedene Ribosomen-Präparationen benutzt, die eine unterschiedliche Aktivität besaßen. Die beiden Präparationen unterschieden sich in der Art, wie die 3oS und 5oS Untereinheiten aus der Saccharose-Lösung isoliert worden waren. Bei der ersten Präparation wurden die Untereinheiten durch 18 Std. Ultrazentrifugation aus der Saccharose-Lösung angereichert, bei der zweiten Präparation durch Fällung der Untereinheiten mit Polyäthylenglykol.

Die biologische Aktivität der Ribosomen wurde mit Hilfe der Polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese bestimmt. Dabei wird (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen gebunden und der gesamte Reaktionsansatz wie im Methodenteil unter 2.6.2. beschrieben,wird über einen Nitrocellulose-Filter abgesaugt.

Die Ribosomen der ersten Präparation banden 75 mMol (^{14}C) Phe-tRNS pro Mol Ribosomen, während die Ribosomen der zweiten Präparation 18o mMol (^{14}C)Phe-tRNS pro Mol Ribosomen banden. (Die Angabe "Mol Ribosomen" bezieht sich hier, wie bei allen Nitrocellulose-Filter-Versuchen, auf die in den Test eingesetzte Ribosomenmenge. Dabei wurde nicht berücksichtigt, daß nicht alle Untereinheiten 7oS-Ribosomen bildeten. In späteren Versuchen, in denen die Ribosomen über Saccharose-Gradienten isoliert wurden, bezieht sich die Angabe Mol Ribosomen auf die isolierte 7oS Ribosomenmenge.)

Das Maximum der Reaktion lag bei der ersten Präparation bei 42 pMol, bei der zweiten Präparation bei 28 pMol Ribosomen vor. Die Reaktion wurde in 1oo µl Volumen mit 21 pMol EF-Tu durchgeführt (Abb. 11).

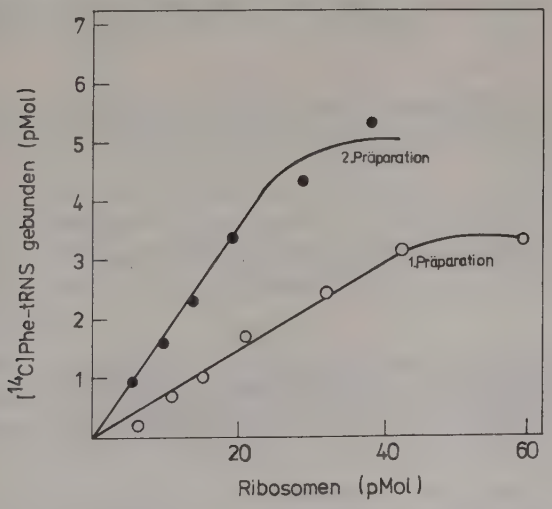


Abb. 11 Abhängigkeit der Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS von der Ribosomenkonzentration

Es wurden jeweils gleiche Konzentrationen an 5oS und 3oS Untereinheiten eingesetzt. Das Inkubationsvolumen betrug 1oo µl. In jeder Probe wurden 21 pMol EF-Tu zur Reaktion gebracht.

3.1.3. Bestimmung der optimalen EF-Tu Konzentration

Die optimale EF-Tu Konzentration wurde wie die Ribosomenkonzentration durch Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen und Absaugen des Reaktionsansatzes über einen Nitrocellulose-Filter bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 12,9 pMol EF-Tu/1oo µl verlief die Reaktion linear. Bei 15,6 pMol EF-Tu/1oo µl erreichte die Synthese ihr Maximum und ging in ein Plateau über (Abb. 12).

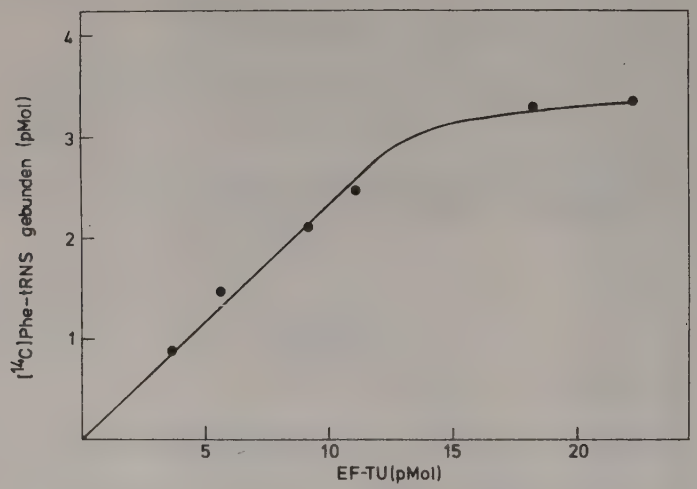


Abb. 12 Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen: Abhängigkeit von der EF-Tu Konzentration

3.2. Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes

Zur Isolierung des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes wurde die Reaktion in 5oo µl Volumen mit 7oS; Poly-U; (^{3}H)EF-Tu; GMP-PCP und (^{14}C)Phe-tRNS durchgeführt. Aus dem Reaktionsgemisch wurde der 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplex auf zwei verschiedene Arten isoliert.

a) Zentrifugation durch 5%ige Saccharose, wobei der 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplex im Sediment enthalten war und alle anderen Reaktionspartner im Überstand verblieben. Im Sediment traten neben dem Komplex noch 5oS und 3oS Untereinheiten auf, die keine 7oS gebildet hatten oder durch Dissoziation der 7oS während der Zentrifugation entstanden waren. 78% der in den Test eingesetzten Ribosomen konnten auf diesem Weg isoliert werden.

b) Zentrifugation in einem 12-3o%igen Saccharose-Gradienten. Die Ausbeute bei dieser Methode betrug nur 1o%. Sie wurde angewendet, um die Bindung von Mol (^{3}H)EF-Tu pro Mol Ribosomen zu bestimmen.

Für die Präparation größerer Mengen des 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplexes wurde der Komplex durch 5%ige Saccharose abzentrifugiert.

3.2.1. Bestimmung der für die Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen notwendigen spezifischen Radioaktivität

Wurde in den Test (^{3}H)EF-Tu sehr hoher spezifischer Radioaktivität eingesetzt, so wurde an den Ribosomen unspezifisch so viel Radioaktivität absorbiert, daß die Bestimmung der spezifischen Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen nicht mehr möglich war.

In Abb. 13A wird die spezifische und unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Ribosomen in Abhängigkeit von der spezifischen Radioaktivität des (^{3}H)EF-Tu wiedergegeben. (^{3}H)EF-Tu wurde mit unmarkiertem EF-Tu auf die entsprechende spezifische Radioaktivität verdünnt. Das (^{3}H)EF-Tu / EF-Tu Gemisch wurde im Überschuß zum Reaktionsansatz gegeben, so daß

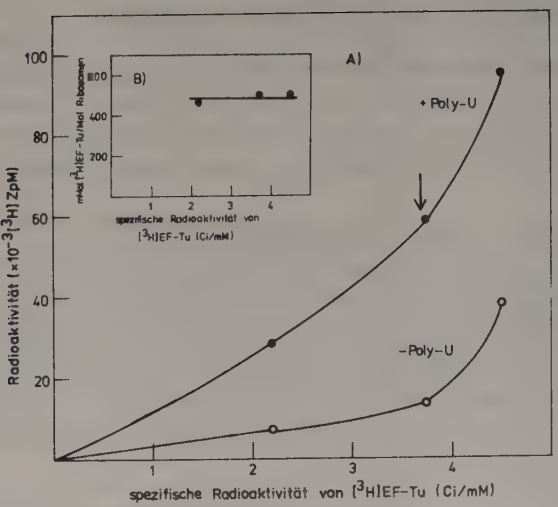


Abb. 13A Spezifische und unspezifische Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen in Abhängigkeit von der spezifischen Radioaktivität des (^{3}H)EF-Tu

Abb.13B Spezifische Bindung von EF-Tu pro Mol isolierter Ribosomen

immer die gleiche Menge Enzym an die Ribosomen gebunden wurde (Abb. 13B).

Bis zu einer spezifischen Radioaktivität des (^{3}H)EF-Tu von 3,8 Ci/mM stieg die unspezifische Bindung von Radioaktivität an die Ribosomen linear an. Die Werte für die spezifische Bindung lagen erheblich höher. Bei höherer spezifischer Radioaktivität des (^{3}H)EF-Tu als 3,8 Ci/mMol war eine proportionale Steigerung der Radioaktivität durch unspezifische Bindung zu beobachten (Abb. 13A). Für die weiteren Versuche wurde daher (^{3}H)EF-Tu mit einer spezifischen Radioaktivität von 3,7 Ci/mMol verwendet.

3.2.2. Optimierung der (^{3}H)EF-Tu Konzentration

Die Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen in Abhängigkeit von der (^{3}H)EF-Tu Konzentration gibt die Abb. 14 wieder. Die Bindung nimmt zunächst linear zu. Bei 2,7 µg (^{3}H)EF-Tu/5oo µl Ansatz ist das Maximum erreicht: Die Kurve geht in ein Plateau über.

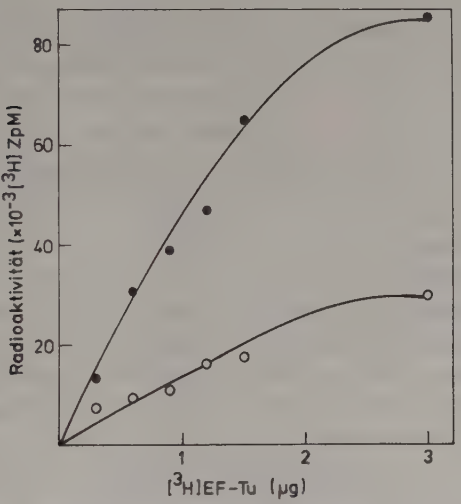


Abb. 14 Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen: Abhängigkeit von der (^{3}H)EF-Tu Konzentration

(Spezifische Radioaktivität: 3,7 Ci/mMol)
Pro Test wurden 58 pMol 7oS Ribosomen eingesetzt. Der 7oS·(^{3}H)EF-Tu Komplex wurde durch Zentrifugation durch 5%ige Saccharose isoliert.

●——● vollständiges System mit 7oS, Poly-U, (^{3}H)EF-Tu, GMP-PCP, (^{14}C)Phe-tRNS

○——○ - Poly-U

3.2.3. Abhängigkeit der Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen von den verschiedenen Reaktionspartnern

Tab. 1 gibt zusammenfassend die Abhängigkeit der Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen von den verschiedenen Reaktionspartnern wieder. Der 70S·(^{3}H)EF-Tu Komplex wurde durch Zentrifugation durch 5%ige Saccharose von nicht gebundenem (^{3}H)EF-Tu getrennt.

Experimentelle Bedingungen	Bindung von (^{3}H)EF-Tu und (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen im 500 µl Standardansatz (Angabe in %)	
	(^{3}H)EF-Tu	(^{14}C)Phe-tRNS
vollständiges System	100	100
hitzeinaktivierte 50S	30	10
- 30S	30	10
- Poly-U	42	10
- 30S, - Poly-U	27	8
- GMP-PCP	27	10
+ GTP	27	100
- (^{14}C)Phe-tRNS	28	--

Tab. 1 Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen in Abhängigkeit von den verschiedenen Reaktionspartnern

Die Bindung von (^{3}H)EF-Tu war abhängig von der Bildung von 70S Ribosomen. Fehlten z.B. 30S Untereinheiten oder/und Poly-U, so wurde kein (^{3}H)EF-Tu und keine (^{14}C)Phe-tRNS an die 50S Untereinheiten gebunden.

Für die Isolierung des 70S·(^{3}H)EF-Tu Komplexes war es notwendig, anstelle von GTP das nicht hydrolosierbare GTP-Analog GMP-PCP im Test zu verwenden. Wurde GTP benutzt, so konnten zwar 70S Ribosomen isoliert werden, an denen aa-tRNS gebunden war; EF-Tu wurde jedoch während der Hydrolyse von GTP von den Ribosomen abgespalten. Fehlte (^{14}C)Phe-tRNS im Reaktionsansatz, so wurde kein (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen gebunden.

4. Quervernetzung von Proteinen mit Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat

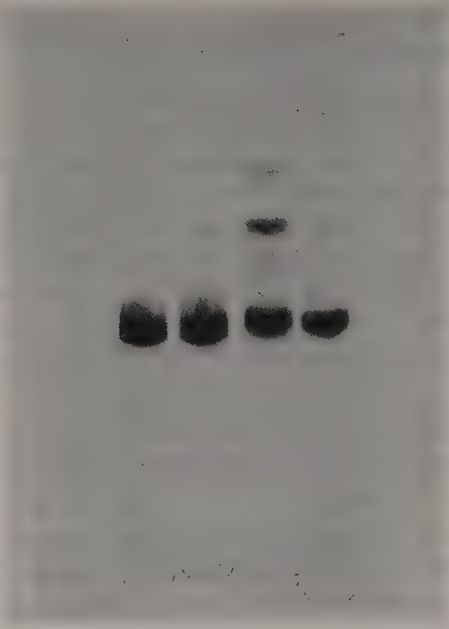
4.1. Quervernetzung von Aldolase

Zunächst wurde das Quervernetzungsreagenz Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat (MBID) an einem tetrameren Protein, der Aldolase, ausgetestet. Bei einer Quervernetzung mit MBID und anschließender Oxydation werden zwischen benachbarten Proteinketten Disulfidbrücken gebildet. Diese kovalenten Bindungen lassen sich durch SDS nicht spalten, während alle sonstigen intermolekularen Wechselwirkungen der Proteine durch SDS aufgehoben werden.

Bei der Untersuchung von quervernetztem Protein auf SDS-Gelen müssen neue Banden auftreten, die Dimere, Trimere usw. des Protein-Monomers darstellen.

Die Quervernetzung der Aldolase wurde auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach Weber & Osborn (1968) nachgewiesen. Auf dem Gel waren drei neue Banden zu sehen, die als Dimere (8o ooo Dalton), Trimere (12o ooo Dalton) und Tetramere (16o ooo Dalton) des Aldolase-Monomers (4o ooo Dalton) identifiziert wurden (Abb. 19).

Durch Reduktion mit β-Mercaptoäthanol (3% β-Mercaptoäthanol, 3o Min. o^{o}C) wurden diese Banden gespalten. Auf dem SDS-Gel wurde nach der Reduktion nur noch die Bande des Monomers nachgewiesen.



a b c d

Abb. 15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(8% Acrylamid) der bei 1o mM Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat quervernetzten Aldolase

a) 5o µg Aldolase; 3% β-Mercaptoäthanol
b) 5o µg Aldolase, ohne β-Mercaptoäthanol
c) 5o µg quervernetzte Aldolase ($Aldolase_S$)
d) 5o µg quervernetzte Aldolase, die reduktiv gespalten wurde ($Aldolase_{SH}$)

4.2. Quervernetzung von EF-Tu und ribosomalem Protein

Für die Quervernetzung von EF-Tu mit ribosomalem Protein boten sich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Durchführung des Experimentes an:

1.) Bindung von EF-Tu an die Ribosomen und Isolierung des 7oS·EF-Tu Komplexes sowie Quervernetzung des Komplexes. Dieser Weg hat zwei Nachteile: Bei der Quervernetzung wird zunächst MBID an die Lysine der Proteine gebunden. Überflüssiges MBID und β-Mercaptoäthanol müssen vor dem Oxydationsschritt durch Dialyse entfernt werden. Während der Dialyse dissoziiert EF-Tu von den Ribosomen.

Bei der Quervernetzung erhält man dadurch eine sehr geringe Ausbeute. 3oS Proteine werden bei dieser Methode ebenfalls quervernetzt und erschweren später die Identifizierung der mit dem EF-Tu quervernetzten 5oS-Proteine.

2.) Bei dieser Möglichkeit wird der 2-Stufen-Reaktionsmechanismus des MBID ausgenutzt: MBID wird an die Lysine von 5oS bzw. EF-Tu gebunden, so daß $5oS_{SH}$ und $EF\text{-}Tu_{SH}$ gebildet werden. $5oS_{SH}$, $3oS_{n}$ (unbehandelte 3oS) und $EF\text{-}Tu_{SH}$ werden zur Bildung des 7oS·EF-Tu Komplexes in die Reaktion eingesetzt. Der 7oS·EF-Tu Komplex wird isoliert und oxydiert. Es kann jetzt nur zwischen 5oS-Proteinen und EF-Tu eine Quervernetzung stattfinden. Die Schwierigkeit bei dieser Methode besteht darin, genügend Quervernetzer zu binden und gleichzeitig die enzymatischen Aktivitäten zu erhalten.

4.2.1. Quervernetzung von ribosomalen 5oS Untereinheiten

5oS Untereinheiten wurden nach Traut et al. (1973) mit verschiedenen MBID-Konzentrationen (2 - 1o mM) inkubiert. MBID, das nicht reagiert hatte, wurde herausdialysiert. Anschließend wurden die Eigenschaften der mit Mercaptobutyrimidat behandelten 5oS Untereinheiten ($5oS_{SH}$) untersucht:

1.) Um ihre enzymatische Aktivität zu bestimmen, wurden die 5oS Untereinheiten in den Test zur Bindung von aa-tRNS eingesetzt.

2.) Auf einem linearen Gradienten von 12 - 3o% Saccharose wurde das Sedimentationsverhalten der oxydierten ($5oS_S$) und reduzierten ($5oS_{SH}$) quervernetzten 5oS Untereinheiten untersucht.

4.2.1.1. Biologische Aktivität von $5oS_{SH}$-Untereinheiten

Abb. 16 gibt die Abhängigkeit der Aktivität der $5oS_{SH}$ Untereinheiten von der MBID Konzentration wieder. Die Aktivität der $5oS_{SH}$ Untereinheiten wurde durch ihre Fähigkeit der Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS dargestellt.

Die Aktivität nahm zunächst ab und erreichte bei 5 - 8 mM MBID ein Plateau, bei dem die enzymatische Aktivität von $5oS_{SH}$ zu 45% gehemmt war. Die Hemmung nahm ab 8 mM stark zu, und bei 1o mM MBID wurde keine (^{14}C)Phe-tRNS mehr an die Ribosomen gebunden (Abb. 16).

Für die weiteren Versuche wurden 5oS Untereinheiten verwendet, die mit 2 mM MBID versetzt wurden und während der Dialyse unter reduktiven Bedingungen gehalten wurden. Diese $5oS_{SH}$ Untereinheiten banden 46o mMol (^{14}C)Phe-tRNS/Mol 7oS. Die biologische Aktivität der $5oS_{SH}$ war zu 73% erhalten.

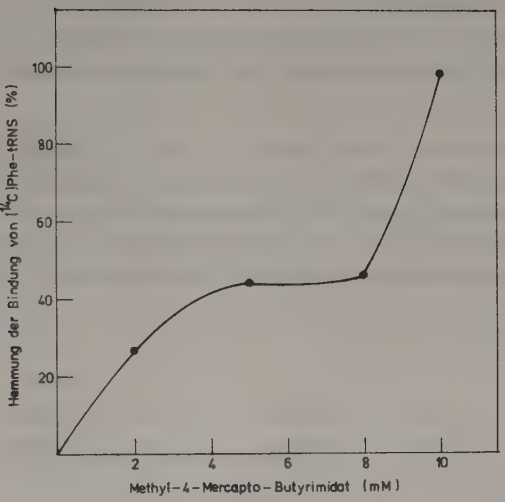


Abb. 16 Hemmung der enzymatischen Aktivität der $50S_{SH}$ Untereinheiten in Abhängigkeit von der MBID-Konzentration

Die Aktivität der $50S_{SH}$ wurde durch Bindung von (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen nachgewiesen. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubation über einen linearen Saccharose-Gradienten (12 - 30% Saccharose) zentrifugiert. Im 70S Gipfel wurde die Absorption bei 260 nm und die Radioaktivität bestimmt.

4.2.1.2. Sedimentationseigenschaften quervernetzter 50S Untereinheiten

Mit 2 mM MBID quervernetzte 50S Untereinheiten ($50S_{SH}$) wurden oxydiert ($50S_S$) und ihr Sedimentationsverhalten auf einem linearen Saccharose-Gradienten (12 - 30% Saccharose) untersucht.

Die Quervernetzung führte weder zu einer Dimerenbildung noch fand eine mit der Sedimentationsmethode feststellbare Konformationsänderung der 50S Untereinheiten statt. Reduktion der 50S Untereinheiten mit β-Mercaptoäthanol führte ebenfalls zu keiner Änderung des Sedimentationsverhaltens (Abb. 17).

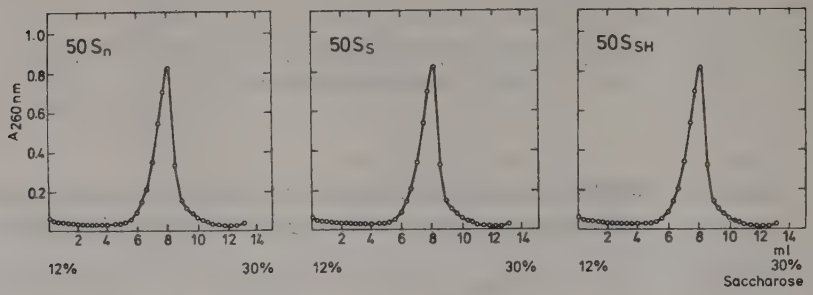


Abb. 17 Sedimentationsverhalten unbehandelter ($50S_n$), quervernetzter und oxydierter ($50S_S$) bzw. reduzierter ($50S_{SH}$) ribosomaler 50S Untereinheiten im linearen Gradienten von 12 - 30% Saccharose.

Pro Gradienten wurden 5 A_{260} 50S Untereinheiten aufgetragen.

4.2.2. Quervernetzung von EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu

4.2.2.1. Biologische Aktivität von EF-Tu$_{SH}$ und (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$

EF-Tu bzw. (^{3}H)EF-Tu wurde mit steigenden Mengen MBID versetzt (4 - 2o mM), während der Dialyse unter reduktiven Bedingungen gehalten und anschließend bezüglich der biologischen Aktivität ausgetestet.

Bis zu einer Konzentration von 2o mM MBID wurde die Bindung von (^{3}H)EF-Tu bzw. (^{14}C)Phe-tRNS an die Ribosomen nur schwach gehemmt. Die Hemmung der Aktivität von EF-Tu stieg linear in Abhängigkeit von der MBID-Konzentration an.

In den folgenden Versuchen wurde EF-Tu bzw. (^{3}H)EF-Tu verwendet, der mit 1o mM MBID behandelt wurde. Die Hemmung der biologischen Aktivität betrug bei 1o mM MBID 7% (Abb. 18).

4.2.2.2. Konformation von quervernetztem EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu

Das Molekulargewicht von unbehandeltem ((^{3}H)EF-Tu), von behandeltem und oxydiertem ((^{3}H)EF-Tu$_S$) sowie von behandeltem und reduziertem ((^{3}H)EF-Tu$_{SH}$) wurde auf einer Biogel P-15o Säule, die eine Ausschlußgrenze von 15o ooo Dalton hat, bestimmt. Die gesamte Radioaktivität des (^{3}H)EF-Tu$_S$ und des (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ wurde in einem einzigen Gipfel eluiert, der dem Molekulargewicht des unbehandelten (^{3}H)EF-Tu entsprach (Abb. 19). Durch die Behandlung mit MBID wurden keine Dimeren oder größeren Aggregate des (^{3}H)EF-Tu gebildet.

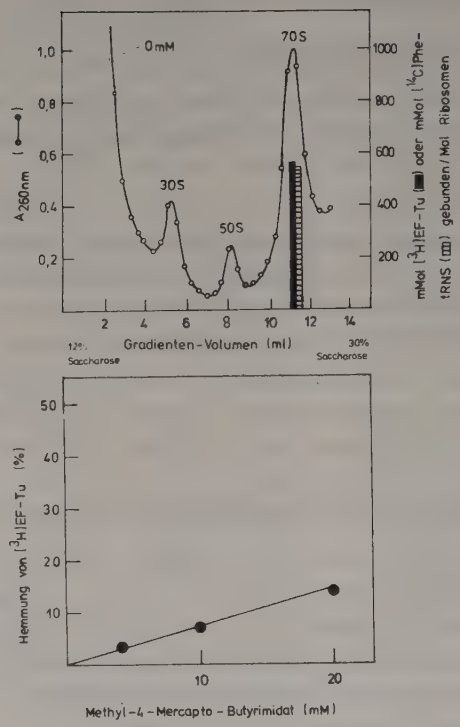
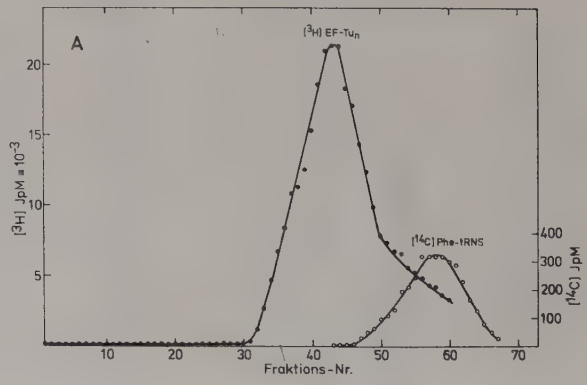
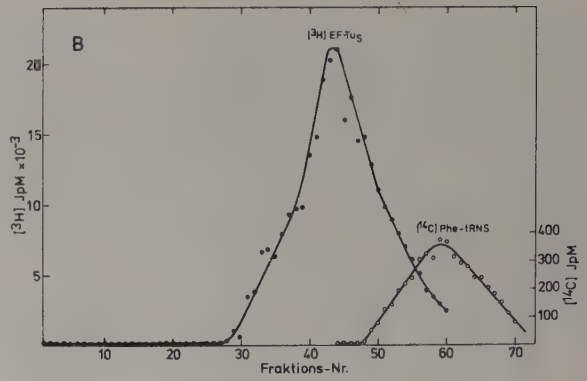


Abb. 18 Hemmung der enzymatischen Aktivität von EF-Tu und (^{3}H)EF-Tu in Abhängigkeit von der MBID Konzentration

1,36 µg EF-Tu$_{SH}$ bzw. (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ (spez. Aktivität: 3,7 Ci/mMol) wurden mit 156 pMol 50S$_n$, 186 pMol 30S$_n$, Poly-U, GMP-PCP und (^{14}C)Phe-tRNS inkubiert.

Der 70S$_n$·(^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ Komplex wurde über einen linearen Gradienten von 12 - 30% Saccharose isoliert. Im 70S Gipfel wurde die Absorption bei 260 nm und die Radioaktivität bestimmt.





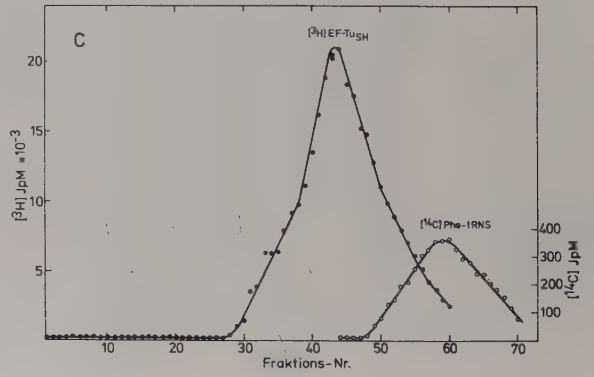


Abb. 19 Säulenchromatographie von A) (^{3}H)EF-Tu$_n$, B) (^{3}H)EF-Tu$_S$, C) (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ über Biogel P 15o

Als Marker für das Molekulargewicht diente (^{14}C)Phe-tRNS (O———O), deren Molekulargewicht 25 ooo Dalton beträgt.

4.3. Quervernetzung von (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ mit ribosomalem Protein

4.3.1. Bindung von (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ an die Ribosomen

Aus unbehandelten 3oS (3oS$_n$), 5oS$_{SH}$ und Poly-U wurden 7oS$_{SH}$ gebildet. Bei diesen 7oS$_{SH}$ war an die Lysinreste der 5oS$_{SH}$ Untereinheiten das Quervernetzungsreagenz MBID gebunden.

An die 7oS$_{SH}$ wurde (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ (spezifische Radioaktivität: 3,7 Ci/mM) gebunden.

Der 7oS$_{SH}$·(^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ Komplex wurde durch 5% Saccharose sedimentiert, in 2o mM TEA-HCl, pH 8,o; 2o mM MgAc gelöst und mit 4o mM H_2O_2 oxydiert. Es wurden 2o7 mMol (^{3}H)EF-Tu pro Mol Ribosomen gebunden. Das entspricht 1oo% der Bindung von unbehandeltem (^{3}H)EF-Tu an unbehandelte 7oS Ribosomen.

Anschließend wurde der 7oS$_S$·(^{3}H)EF-Tu$_S$ Komplex über einen linearen Gradienten von 12 - 3o% Saccharose zentrifugiert. Behandelte und unbehandelte Ribosomen waren bei der Bindung von (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ bzw. (^{3}H)EF-Tu$_n$ gleich aktiv. Wurde der 7oS$_n$·(^{3}H)EF-Tu$_n$ Komplex über einen Gradienten zentrifugiert, in dem kein GMP-PCP vorhanden war, dissoziierten während der 15-stündigen Zentrifugation 5o% des gebundenen (^{3}H)EF-Tu von den Ribosomen. GMP-PCP in der Saccharose erhöhte die Stabilität des 7oS$_n$·(^{3}H)EF-Tu$_n$ erheblich: 56o mMol (^{3}H)EF-Tu$_n$ bzw. (^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ wurden pro Mol 7oS$_n$ bzw. 7oS$_{SH}$ gebunden.

4.3.2. Nachweis der kovalenten Bindung zwischen (^{3}H)EF-Tu$_S$ und 7oS$_S$ Ribosomen

Gordon et al. (1971) zeigen, daß EF-Tu bei Behandlung der Ribosomen mit 1 M NH_4Cl von den Ribosomen dissoziiert. Sofern EF-Tu durch das Quervernetzungsreagenz kovalent an die Ribosomen gebunden ist, müßte EF-Tu nach Salzwaschung der Ribosomen weiterhin gebunden bleiben.

Der 7oS$_{SH}$·(^{3}H)EF-Tu$_{SH}$ Komplex wurde über 5% Saccharose isoliert und anschließend oxydiert. Dann wurde der 7oS$_S$·(^{3}H)EF-Tu$_S$ Kom-

plex auf 1 M NH_4Cl gebracht und über einen linearen Gradienten von 12 - 3o% Saccharose zentrifugiert. 89% (^{3}H)EF-Tu blieben beim quervernetzten $7oS_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplex nach der Salzbehandlung an die Ribosomen gebunden. Beim nicht behandelten $7oS_n \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_n$ Komplex bewirkte die Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M NH_4Cl die völlige Dissoziation des (^{3}H)EF-Tu von den Ribosomen. Reduktion des $7oS_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplexes mit β-Mercaptoäthanol und anschließende Salzbehandlung führten ebenfalls zur völligen Dissoziation des $(^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$ von den Ribosomen (Tab. 2).

Aus diesen Versuchen wurde der Schluß gezogen, daß der Elongationsfaktor mit einem oder mehreren ribosomalen Proteinen quervernetzt war.

Experimentelle Bedingungen					Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen	
5oS	(^{3}H)EF-Tu	H_2O_2	β-Mercaptoäthanol	1 M NH_4Cl	$\frac{\text{mMol}(^3H)\text{EF-Tu}}{\text{Mol 7oS}}$	%
+	+	+	-	-	547	1oo
+	+	+	-	+	486	89
-	+	+	-	-	56o	1oo
-	+	+	-	+	o	o
+	+	+	+	-	553	1oo
+	+	+	+	+	o	o

Tab. 2 Quervernetzung von (^{3}H)EF-Tu mit ribosomalem Protein

Bindung von (^{3}H)EF-Tu an die Ribosomen nach Salzbehandlung der Ribosomen. 5oS, (^{3}H)EF-Tu: + = quervernetzt;
- = unbehandelt

4.3.3. Dissoziation des $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplexes

Der $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplex wurde dissoziiert, um festzustellen, ob bei der Oxydation des $70S_{SH} \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$ Komplexes Disulfidbrücken zwischen $30S_n$- und $50S_{SH}$-Protein(en) bzw. $30S_n$-Protein(en) und $(^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$ gebildet wurden. Sobald zwischen diesen Proteinen kovalente Bindungen geschaffen werden, können die $70S_S$ Ribosomen nicht mehr dissoziieren.

Der $70S_{SH} \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_{SH}$ Komplex wurde über 5% Saccharose isoliert. Nach der Oxydation wurde der $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplex 16 Std. bei 4^oC gegen 20 mM Tris-HCl pH 7,8; 0,3 mM MgAc; 20 mM H_2O_2 dialysiert.

Anschließende Zentrifugation über einen linearen Gradienten von 12 - 30% Saccharose zeigte, daß der $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplex bei niedriger Mg^{2+}Konzentration in seine ribosomalen Untereinheiten dissoziierte (Abb. 20). Die aus dem quervernetzten Komplex stammenden ribosomalen Untereinheiten wiesen keine feststellbare Konformationsänderung auf. Sie zeigten die gleichen Sedimentationseigenschaften wie unbehandelte 30S und 50S Untereinheiten.

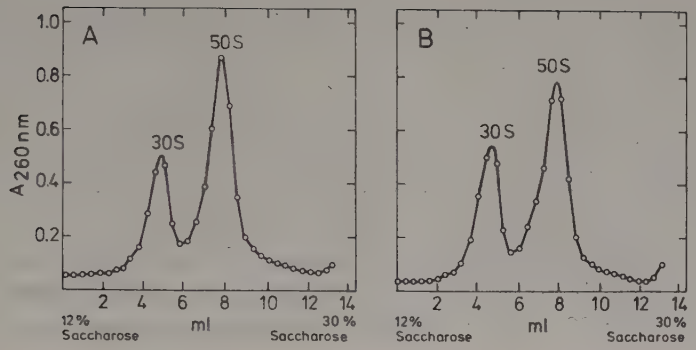


Abb. 2o Dissoziation des quervernetzten $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplexes bei niedriger Mg^{2+} Konzentration

A) Dissoziation des $70S_n \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_n$ Komplexes
B) Dissoziation des $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplexes

Je 25o pMol Komplex wurden auf einen linearen Gradienten von 12 - 3o% Saccharose aufgetragen.

4.4. Isolierung und Identifizierung der mit EF-Tu quervernetzten ribosomalen Proteine

Die Proteine des (^{3}H)70S$_S$·EF-Tu$_S$ Komplexes wurden mit Essigsäure extrahiert. Die extrahierten Proteine (TP (^{3}H)70S$_S$·EF-Tu$_S$) wurden gegen 20 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 M LiCl; 1,2 M Harnstoff dialysiert. Dieser Puffer, in dem die ribosomalen Proteine löslich sind, ist der Ligandenpuffer der Affinitätschromatographie. Die mit EF-Tu quervernetzten ribosomalen Proteine wurden durch Affinitäts-Chromatographie von den übrigen ribosomalen Proteinen getrennt. Die Affinitäts-Chromatographie erfolgte über eine Sepharose 4 B-Säule, die mit gegen EF-Tu gerichteten Antikörpern beladen war. Proteine, die kovalent an EF-Tu gebunden waren, wurden dadurch an die Sepharose gebunden.

Mit 8 M Harnstoff im sauren Bereich bei pH 2,0 wird die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung durch Denaturierung der Antikörper aufgehoben. Der EF-Tu$_S$·(^{3}H)Protein$_S$ Komplex wurde auf diese Weise mit 8 M Harnstoff pH 2,0 unter Zusatz von 100 µg TP 50 als "Träger" extrahiert.

Nach der Affinitäts-Chromatographie wurde der eluierte (^{3}H)Protein·EF-Tu Komplex mit β-Mercaptoäthanol gespalten. Nach stufenweiser Dialyse gegen 20%, 10% und 2% Essigsäure wurden die Proteine lyophilisiert.

Die lyophilisierten Proteine wurden mit Hilfe einer Mikro- bzw. Mini-zwei-dimensionalen Gelelektrophorese voneinander getrennt. Die einzelnen Proteinflecken wurden ausgestochen und die in ihnen enthaltene Radioaktivität bestimmt. Anhand der Radioaktivität konnten die quervernetzten Proteine identifiziert werden.

4.4.1. Angaben über das gegen EF-Tu gerichtete Antiserum

Für die Affinitäts-Chromatographie wurden in einer Reihe von Präparationen Antikörper von zwei verschiedenen Kaninchen verwendet. Die Titer der Seren wurden im Ouchterlony-Diffusionstest bei beiden Seren mit 7,15 µl Serum/1 µg EF-Tu bestimmt.

In der Immunelektrophorese wandert das Antigen zur Anode. Im Vergleich mit menschlichen Serumproteinen ist es weniger negativ geladen als die Albumine. Bei der Präzipitation des Antigens (EF-Tu) mit dem Antiserum tritt eine einzige Präzipitationslinie auf (Abb. 21). Daraus ist zu folgern, daß in der Antigenpräparation keine Verunreinigungen vorhanden sind, gegen die Antikörper gebildet werden.

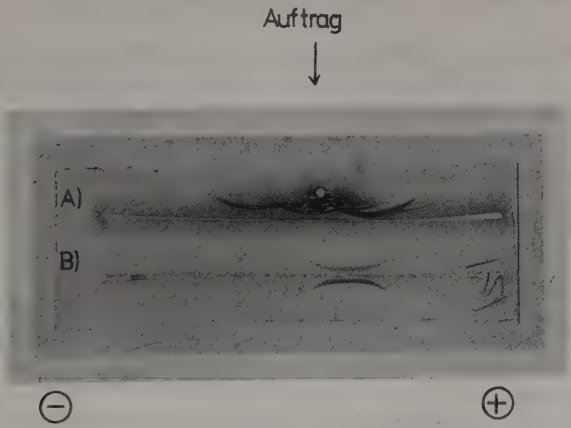


Abb. 21 Immunelektrophoretische Untersuchung des gegen EF-Tu gerichteten Antiserums im Vergleich mit Pferdeantihumanserum

A) Pferdeantihumanserum
B) Anti - EF-Tu

4.4.2. Radioaktive Markierung von ribosomalen $50S_{SH}$ Untereinheiten

Zur Identifizierung der mit EF-Tu quervernetzten ribosomalen Proteine der großen Untereinheiten wurden radioaktive 50S Untereinheiten verwendet.

$50S_{SH}$ Untereinheiten wurden durch reduktive Methylierung (Moore & Crichton 1973) radioaktiv markiert. Die radioaktiven ribosomalen Untereinheiten waren funktionell voll aktiv. Die spezifische Radioaktivität betrug 54 Ci/mM. Die (^{3}H)$50S_{SH}$ Untereinheiten wurden in den Test zur Bindung von EF-Tu an die Ribosomen eingesetzt. Der (^{3}H)$70S_{SH}$·$EF\text{-}Tu_{SH}$ Komplex wurde über 5% Saccharose isoliert, oxydiert und die Proteine mit Essigsäure (Kaltschmidt & Wittmann 1972) extrahiert.

4.4.3. Affinitäts-Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu

Abb. 22 zeigt die Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu über Sepharose 4 B, die mit Anti·EF-Tu Serum bzw. mit Nonimmunserum beladen war. Dabei wurde (^{3}H)EF-Tu auch an der mit Nonimmunserum beladenen Sepharose adsorbiert. Es handelte sich dabei um eine unspezifische Adsorption an die Sepharose.

Das Nonimmunserum bildete im Ouchterlony-Diffusionstest kein Präzipitat mit EF-Tu.

Pro Säule (o,8 x 8 cm) wurden 1,5 µg (^{3}H)EF-Tu gebunden, die mit 6 M Harnstoff, 1 M LiCl, 5o mM Tris-HCl pH 7,8 eluiert wurden und o,2 µg (^{3}H)EF-Tu, die mit 8 M Harnstoff pH 2,o eluiert wurden.

In späteren Versuchen wurde der Elutionsschritt mit 6 M Harnstoff, 1 M LiCl weggelassen und das Antigen gleich mit 8 M Harnstoff pH 2,o eluiert. Dadurch wurde zwar mehr unspezifisches Material extrahiert, aber gleichzeitig auch die Ausbeute an spezifisch gebundenem Material erhöht.

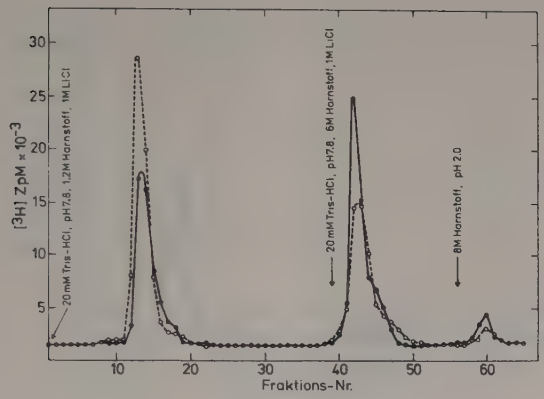


Abb. 22 Affinitäts-Chromatographie von (^{3}H)EF-Tu

21,3 µg (^{3}H)EF-Tu (spezifische Radioaktivität 177 mCi/mM) wurden auf Sepharose 4B aufgetragen, die
a) mit gegen EF-Tu gerichteten Antikörpern (●——●)
b) mit Nonimmunserum (O- - - -O)
beladen war.

4.4.4. Affinitäts-Chromatographie von ribosomalen (^{3}H)5oS Proteinen

Auch (^{3}H)5oS Proteine wurden an der Sepharose adsorbiert. Selbst durch Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Liganden-Puffer auf 4 M konnte diese unspezifische Bindung nicht verhindert werden. Abb. 23 zeigt die Chromatographie von TP (^{3}H)5o über Sepharose 4B, an die Nonimmunglobuline gekuppelt waren.

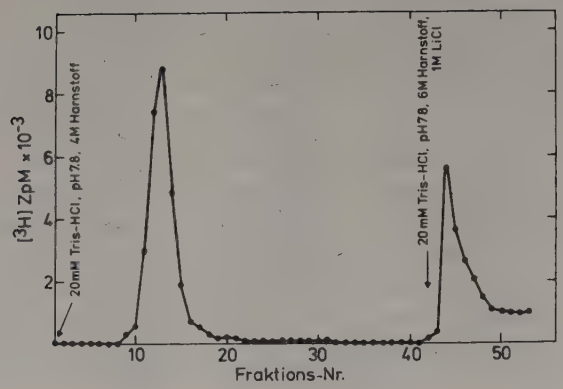


Abb. 23 Affinitäts-Chromatographie von TP (^{3}H)5o

An die Sepharose 4B waren Globuline des Nonimmunserums gebunden. 11,7 pMol TP (^{3}H)5o (spezifische Radioaktivität 27 Ci/mMol) wurden in 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 4 M Harnstoff aufgetragen und mit 2o mM Tris-HCl pH 7,8; 6 M Harnstoff; 1 M LiCl eluiert.

4.4.5. Affinitäts-Chromatographie von TP (^{3}H)7o$_S$·EF-Tu$_S$

Da schon bei der Nonimmunserum-Sepharose (^{3}H)EF-Tu und TP (^{3}H)5o adsorbiert wurde, mußte der (^{3}H)Protein$_S$·EF-Tu$_S$ Komplex jeweils über eine Antiserum- und eine Nonimmunserum-Säule parallel isoliert werden. Von jeder dieser Säulen wurden die Radioaktivität enthaltenden 8 M Harnstoff-Fraktionen vereint und mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese analysiert. In Abb. 24 wird die Affinitäts-Chromatographie der mit Essigsäure aus dem (^{3}H)7o$_S$·EF-Tu$_S$ Komplex extrahierten Proteine dargestellt. 79oo (^{3}H)ZpM wurden spezifisch an die mit Anti·EF-Tu Globulinen beladene Sepharose-Säule gebunden.

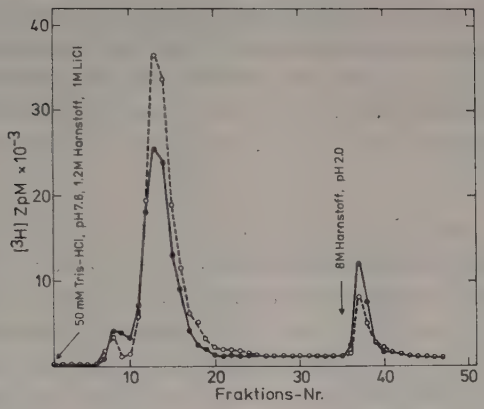


Abb. 24 Affinitäts-Chromatographie von TP(^{3}H)7o$_S$·EF-Tu$_S$ über eine mit Anti-EF-Tu beladene Sepharose-Säule (●——●) bzw. über eine mit Nonimmunserum beladene Sepharose-Säule (O- - - -O).

4.4.6. Gelelektrophorese der extrahierten Proteine

Nach der Elution mit 8 M Harnstoff, pH 2,o, wurde der quervernetzte Komplex zwischen EF-Tu und einem (oder mehreren) 5oS-Protein(en) mit β-Mercaptoäthanol gespalten. Die Proteine wurden stufenweise gegen 2o%, 1o%, 2% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert. Von je einem Säulenlauf wurde eine Mikro-2D (mit 1oo µg TP 5o als "Träger") oder eine Mini-2D (mit 6oo µg TP 5o als "Träger") angefertigt. Die Proteinflecken wurden angefärbt und ausgeschnitten. Aus den Gelstückchen wurden die Proteine mit Soluene extrahiert und die Radioaktivität bestimmt.

4.4.7. Auswertung der Ergebnisse

Bei der mit Nonimmunserum beladenen Sepharose wurden Proteine der (^{3}H)5oS Untereinheiten und der (^{3}H)EF-Tu unspezifisch gebunden. Die Analyse der Proteine mit Hilfe der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese zeigte, daß an dieser unspezifischen Bindung alle 5oS Proteine (und nicht einzelne besonders stark) beteiligt waren.

Von jeder Probe TP(^{3}H)7o$_S$·EF-Tu$_S$ wurde eine Hälfte über eine mit Anti-EF-Tu beladene Sepharose-Säule, die andere über eine mit Nonimmunserum beladene Sepharose-Säule gegeben. Nach reduktiver Spaltung des quervernetzten Proteinkomplexes werden die aus jeder Säule eluierten Proteine getrennt auf eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetragen und die Radioaktivität der Proteine bestimmt.

Bei der Auswertung der Platten wurde die Radioaktivität jedes einzelnen Proteins (L1 - L34)von der NIS-Säule (NIS = Nonimmunserum) gleich 1oo% gesetzt. Auf diesen 1oo%-Wert wurde die Radioaktivität der Proteine von der mit Anti-EF-Tu beladenen Sepharose bezogen. Dabei ergab sich für einige Proteine erwartungsgemäß ein höherer Wert als 1oo%.

Die Ergebnisse mehrerer Versuche wurden dann zusammengefaßt. Jeder Versuch beinhaltet eine neue Präparation von (^{3}H)7oS$_S$·EF-Tu$_S$, Extraktion der Proteine, Affinitäts-Chromatographie, Spaltung des quervernetzten Protein-Komplexes und Identifizierung der quervernetzten Proteine unter Verwendung der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 wiedergegeben. Bei der Auswertung der Daten wurde mit einer Fehlergrenze von $\pm$ 15% gerechnet.

Von jedem Protein wurde die Standardabweichung errechnet. Das mittlere Verhältnis (R) von Variationsbreite zur Standardabweichung gibt einen Hinweis, inwiefern das in einer bestimmten Anzahl von Versuchen gewonnene Ergebnis für eine größere Anzahl von Versuchen gültig ist.

In Tab. 3 ist die Standardabweichung und der R-Wet für die quervernetzten Proteine der 5oS Untereinheiten angegeben.

4.4.8. Identifizierung der quervernetzten Proteine

Die Proteine L1, L3, L23, L24, L28 zeigen gegenüber denen von der mit Nonimmmunserum beladenen Sepharose eluierten Proteinen eine erhöhte Radioaktivität (Abb. 25).

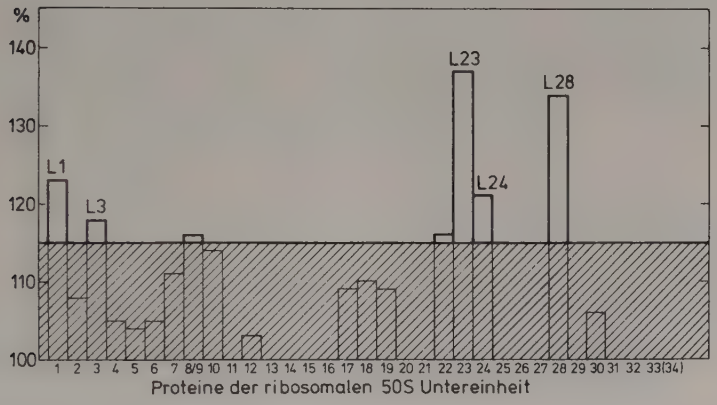


Abb. 25 Bestimmung der im quervernetzten EF-Tu*5oS Protein Komplex vorhandenen ribosomalen Proteine.

Die Radioaktivität der von der NIS-Säule extrahierten Proteine wurde mit 1oo% benannt (weiteres s.Text).

Dies deutet auf eine Quervernetzung der Proteine mit EF-Tu hin. Allerdings ist es nicht auszuschließen, daß nur eines (oder wenige) der Proteine mit dem EF-Tu vernetzt ist (sind), und daß die übrigen Proteine mit diesem (diesen) Protein(en) kovalent verbunden sind.

Über die Signifikanz der in Abb. 25 angegebenen Daten gibt der R-Wert Auskunft (Tab. 3). Er ist definiert als mittleres Verhältnis (R) von Variationsbreite zur Standardabweichung in Stichproben des Umfangs n aus Grundgesamtheiten mit Normal-

verteilung. Für Stichproben des Umfangs n = 8 wurde für R ein Durchschnittswert von R = 2,85 gefunden. Da dieser Wert ein Durchschnittswert ist, stimmt er im allgemeinen nicht genau mit den gefundenen Werten überein. Werte, die sehr viel niedriger als der Durchschnittswert liegen, erhöhen sich bei einer größeren Anzahl von Versuchen, Werte, die sehr viel höher als der Durchschnittswert liegen, erniedrigen sich bei einer größeren Anzahl von Versuchen.

ribosomales Protein	Mittelwert	Standardabweichung	R-Wert
L1	123	18,6	4,8
L3	118	28,1	2,1
L23	138	33	3,3
L24	122	27,8	3,45
L28	134	32,6	2,52

Tab. 3 Standardabweichung und R-Wert für die quervernetzten ribosomalen Proteine

III. Diskussion

1. Grenzen der angewandten Methoden

1.1. Quervernetzung

Bei der Quervernetzung von Proteinen mit bifunktionellen Reagenzien können benachbarte Proteine, die sich in einer durch die Länge des Quervernetzers bestimmten räumlichen Entfernung befinden, miteinander kovalent miteinander verbunden werden. Das Ausmaß der Quervernetzung der ribosomalen Untereinheiten ist abhängig von:

a) der Entfernung der Proteine voneinander
b) der Tertiärstruktur der Proteine
c) der Anordnung der RNS-Moleküle in den Untereinheiten, die die Proteine möglicherweise gegen Quervernetzung schützen
d) der Anzahl und der Lage der reaktiven Gruppen innerhalb der Proteine (im Fall des Methyl-4-Mercapto-Butyrimidats von der Anzahl und Anordnung der freien Aminogruppen).

Welche Aussagekraft haben die mit bifunktionellen Quervernetzern erhaltenen Ergebnisse?

Die Ergebnisse sagen nur dann etwas über die räumliche Nachbarschaft von Proteinen aus, wenn Proteinpaare vorliegen. Selbst in diesem Fall sagt die Quervernetzung nichts über die Lage der Gesamtmasse der Proteine aus. Es ist vorstellbar, daß sich von den quervernetzten Proteinen nur kurze Stücke in unmittelbarer Nachbarschaft befinden, während die Hauptmassen der Proteine an wesentlich weiter entfernten Stellen liegen. Um genauere Angaben über die Nachbarschaftsbeziehungen von Proteinen zu erhalten, müßten die Sequenzen der Proteine bekannt sein und die Positionen der quervernetzten Aminosäuren bestimmt werden.

Beim Auftreten von Proteinkomplexen von mehr als zwei Proteinen können keine Angaben über die Nachbarschaftsbeziehungen der quervernetzten Proteine gemacht werden, da nicht bekannt ist, welches Protein mit welchem quervernetzt ist.

Die Methode der Quervernetzung unterliegt also den gleichen begrenzenden Faktoren wie z.B. die Herstellung von RNP-Fragmenten oder die Bindung von Antikörpern an die Ribosomen, zwei Techniken, die wie die Quervernetzung zur Aufklärung der Topographie der Ribosomen angewendet werden. Auch bei diesen Methoden werden von der Bindung der Proteine an die RNP-Fragmente oder der Bindung von Antikörpern an benachbarte Stellen auf den Ribosomen Rückschlüsse auf die Nachbarschaft der Proteine gezogen.

Bei der Präparation des $70S_n \cdot EF\text{-}Tu_n$ Komplexes und dessen Quervernetzung können Vernetzungen zwischen folgenden Komponenten auftreten:

a) EF-Tu und 50S Proteinen
b) EF-Tu und 30S Proteinen
c) 50S Proteinen und 30S Proteinen
d) innerhalb der 50S Ribosomen
e) innerhalb der 30S Ribosomen.

Die Möglichkeiten der Quervernetzung bei b), c) und e) können ausgeschlossen werden, weil das Quervernetzungsreagenz getrennt an die 50S Ribosomen und an EF-Tu gebunden wird. Solange die Untereinheiten und EF-Tu unter reduktiven Bedingungen gehalten werden, sind sie weiterhin aktiv. Die Schwierigkeit bei dieser Methode besteht darin, genügend Quervernetzer zu binden und gleichzeitig die funktionellen Aktivitäten zu erhalten.

Dissoziation des $70S_S \cdot (^3H)EF\text{-}Tu_S$ Komplexes zeigt, daß bei dieser Methode keine kovalenten Bindungen zwischen 30S und 50S Untereinheiten bzw. (^3H)EF-Tu und 30S Proteinen gebildet werden.

Es wurde außerdem nachgewiesen, daß bei der Quervernetzung von 50S keine interribosomale Quervernetzung auftritt. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der quervernetzten Untereinheiten zeigt, daß sie dieselben Sedimentationseigenschaften besitzen wie unbehandelte 50S und keine höhermolekularen Aggregate bilden.

1.2. Isolierung der quervernetzten Proteine

Bei Sedimentation des $70S_{SH}$·EF-Tu_{SH} Komplexes befinden sich im isolierten Material auch 50S und 30S Untereinheiten, die keine 70S gebildet haben und 70S Ribosomen, an die kein EF-Tu gebunden ist. Das stimmt mit den Ergebnissen von Gilbert (1969) überein: Nur ein Teil der Ribosomen in einer gegebenen Population ist funktionell aktiv.

Es ist nicht notwendig, die funktionell aktiven Ribosomen von den inaktiven zu trennen, da bei der Affinitäts-Chromatographie über mit Anti-EF-Tu beladene Sepharose nur die in einem Komplex mit EF-Tu quervernetzten Proteine spezifisch an die Antikörper gebunden werden.

Die immunologische Technik wurde in dieser Arbeit nur zur Isolierung des EF-Tu·50S Protein Komplexes benutzt. Sie eignet sich dazu, auch geringste Mengen von quervernetzten Proteinen aus dem Gesamtgemisch zu isolieren. Voraussetzung ist, daß die Antigenität des EF-Tu während der Quervernetzung nicht verloren geht.

Dieses Isolierungsverfahren ist der limitierende Faktor beim Nachweis der quervernetzten Proteine, da in gewissem Umfang auch an der mit Nonimmunserum beladenen Sepharose (^{3}H)EF-Tu und TP(^{3}H)50 adsorbiert werden. Dadurch wird die Identifikation der quervernetzten Proteine erschwert.

1.3. Identifizierung der quervernetzten Proteine

Die Anwendung der zwei-dimensionalen Harnstoff-Gelelektrophorese zur Identifizierung der im quervernetzten EF-Tu·50S Protein Komplex vorliegenden Einzelproteine ist eine zuverlässige Methode. Sie ist jedoch nur bei spaltbaren Quervernetzern anwendbar. Voraussetzung ist, daß sich weder durch die Quervernetzung noch durch die Spaltung die elektrophoretischen Eigenschaften der Proteine ändern.

2. In der Literatur beschriebene Ergebnisse aus Quervernetzungsversuchen an ribosomalen 5oS Untereinheiten

Für die 5oS Untereinheiten liegen im Vergleich zu den 3oS Untereinheiten relativ wenige Ergebnisse aus Quervernetzungsversuchen vor. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die bisher nachgewiesenen Protein-Nachbarschaftsbeziehungen in den 5oS und die dabei verwendeten bifunktionellen Reagenzien.

Quervernetzte Proteine	Literatur
Dimethylsuberimidat, Länge: 12 Å	
L2-L9	Expert-Bezançon & Barritault (1975)
L2-L13-L2o	Barritault, pers. Mitteilung
L2-L29	Barritault, pers. Mitteilung
L5-L1o-L11-L13	Clegg & Hayes (1974)
L7/L12-L1o	Expert-Bezançon & Barritault (1975)
L7/L12-L11	Expert-Bezançon & Barritault (1975)
L8-L1o oder L11	Clegg & Hayes (1974)
L9-L1o-L11	Clegg & Hayes (1974)
L1o-L11	Barritault, pers. Mitteilung
L13-L14	Barritault, pers. Mitteilung
L14-L17	Barritault, pers. Mitteilung
L17-L19	Barritault, pers. Mitteilung
L17-L23	Barritault, pers. Mitteilung
L17-L32	Expert-Bezançon & Barritault (1975)
L2o-L27-L31-L33	Barritault, pers. Mitteilung
Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat, Länge: 14 Å	
L2-L7/L12	Kenny et al. (1975)
L5-L7/L12	Kenny et al. (1975)
L17-L32	Kenny et al. (1975)
Difluordinitrobenzol, Länge: 6 Å	
EF-G - L7/L12-L2-Lx	Acharya et al. (1973)

Tab. 4. Übersicht der quervernetzten Proteine der 5oS Untereinheiten

Es wurden dabei bifunktionelle Quervernetzungsreagenzien von 12 Å (Dimethylsuberimidat), 17 Å (Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat) und 6 Å (Difluordinitrobenzol) Länge verwendet.

Dimethylsuberimidat ist durch Ammoniakbehandlung spaltbar, Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat durch Reduktion mit β-Mercaptoäthanol.

Die mit Dimethylsuberimidat quervernetzten Komplexe werden folgendermaßen identifiziert: Die quervernetzten Komplexe werden auf einem SDS-Gel auf Grund ihres Molekulargewichtes von den anderen Proteinen getrennt. Nach Spaltung der Komplexe mit Ammoniak werden die Einzelproteine mit Hilfe der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese identifiziert. Dabei ergibt sich, daß die Molekulargewichte der quervernetzten Proteinkomplexe teilweise unter den Molekulargewichten liegen, die sich aus den Einzelproteinen errechnen lassen. Die Autoren nehmen an, daß z.B. L5-L1o-L11-L13 und L9-L1o-L11 in Komplexen auftreten, die ein stark verändertes elektrophoretisches Verhalten aufweisen (Clegg & Hayes 1974).

Die mit Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat quervernetzten Proteine werden auf einem ein-dimensionalen SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht von den anderen Proteinen getrennt. Die quervernetzten Proteine werden im Gel reduktiv gespalten und in einer SDS-Gelelektrophorese in der zweiten Dimension in die Einzelproteine aufgetrennt. Diese Einzelproteine werden mit Hilfe der zwei-dimensionalen Harnstoff-Gelelektrophorese identifiziert (Kenny et al. 1974).

Bei der Quervernetzung von EF-G an die 5oS Untereinheiten betrug das Molekulargewicht der aus quervernetzten Proteinen bestehenden Komplexe 2oo ooo Dalton und 135 ooo Dalton (Acharya et al. 1973). In diesen Komplexen sind L7/L12 und L2 enthalten. 5oS Ribosomen wurden aus den Einzelproteinen und RNS mit ^{3}H markiertem L7/L12 rekonstituiert und ^{35}S markierter EF-G an diese Ribosomen gebunden. Der (^{3}H)5oS·(^{35}S)EF-G Komplex wurde mit Difluordinitrobenzol quervernetzt und der (^{3}H)L7/L12·(^{35}S)EF-G Komplex isoliert. Aus dem Verhältnis ^{3}H:^{35}S errechneten die Autoren ein molares Verhältnis von 2 - 2,5 Mol L7/L12 pro Mol EF-G.

Die in dieser Arbeit identifizierten, im Komplex mit EF-Tu vorliegenden Proteine werden in Abb. 26 in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Autoren zur Topographie der Ribosomen dargestellt. Nur eines von den hier identifizierten Proteinen (L23) wurde bisher unter Verwendung bifunktioneller Quervernetzungsreagenzien mit einem anderen ribosomalen Protein (L17) quervernetzt (Barritault, pers. Mitteilung).

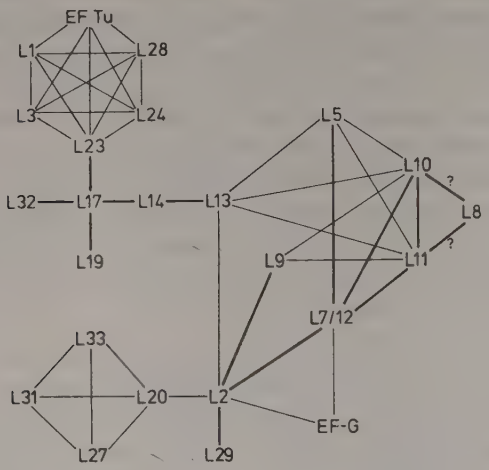


Abb. 26 Ergebnisse aus verschiedenen Quervernetzungsversuchen an 5oS

Zur Darstellung gelangen Proteinpaare (——) und Proteinkomplexe mit mehr als zwei Proteinen (———). Quervernetzte Proteine, bei denen ein Protein nicht sicher identifiziert ist, werden mit einem Fragezeichen versehen.

3. Angaben zu den im Komplex mit EF-Tu auftretenden quervernetzten Proteinen der 5oS Untereinheiten

L1:

Das Molekulargewicht beträgt 22 ooo Dalton. L1 bindet an die 23S RNS (Garrett et al. 1974). Zur Lage von L1 am Ribosom sei auf das Modell von Tischendorf et al. (1975) verwiesen. L1 liegt am rechten äußeren Rand des Sessels der 5oS Untereinheiten. Es liegt im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter 7oS Ribosomen oder in dessen unmittelbarer Nähe (Morrison et al. 1973; Stöffler 1974). Für die Assoziation von 5oS 1,o LiCl-cores mit den 3oS Untereinheiten ist L1 zusammen mit L11 bzw. L16 notwendig (Kazemie 1975).

L3:

Das Molekulargewicht beträgt 23 ooo Dalton. L3 bindet an die 23S RNS (Garrett et al. 1974).

L23:

Das Molekulargewicht beträgt 12 5oo Dalton. Es bindet an die 23S RNS (Garrett et al. 1974). L23 liegt im "Sitz" der "sesselförmigen Krone" der 5oS Untereinheiten (Tischendorf et al. 1975). Es liegt im Untereinheiten-Grenzbereich undissoziierter Ribosomen oder in dessen unmittelbarer Nähe (Zeichhardt 1976). Bei undissoziierten 7oS ist das Protein L23 durch Antikörper gegenüber dissoziierten Untereinheiten fast nicht erreichbar. Antigen-bindende Antikörper-Fragmente (Fab's) gegen L23 verhindern die Reassoziation von Ribosomen-Untereinheiten (Highland et al. 1974; Morrison et al. 1973). Anti-L23 hemmt bei Zusatz zu dissoziierten Untereinheiten die EF-Tu abhängige GTP-Hydrolyse, bei Zusatz zu 7oS Ribosomen findet dagegen keine Hemmung statt (Stöffler 1974). Dieser Effekt läßt sich dadurch erklären, daß für die faktorenabhängige GTPase-Aktivität eine Assoziation der Untereinheiten zu 7oS Ribosomen erforderlich ist. Bei Behandlung von dissoziierten Ribosomen hemmt Anti-L23 die EF-Tu anhängige Anlagerung von Phe-tRNS an die Ribosomen. Bei Behandlung von 7oS Ribosomen mit Anti-L23 ist dessen Wirkung wesentlich geschwächt (Stöffler 1974).
Die Proteine L17 und L23 können mit Dimethylsuberimidat (Länga: 12 Å) quervernetzt werden (Barritault, pers. Mitteilung).

L24:
Das Molekulargewicht beträgt 17 5oo Dalton. L24 bindet an die 23S RNS (Garret et al. 1974). Affinitätsmarkierung von L24 mit einem tRNS-Analog, das sich in der "P-Region" befindet und eine längere Peptidkette trägt, deutet darauf hin, daß L24 ein Protein der "P-Region" ist (Eilat et al. 1974).

L28:
Das Molekulargewicht beträgt 15 ooo Dalton. Im übrigen ist noch relativ wenig über die Funktion dieses Proteins bekannt.

Vier der fünf Proteine binden an die 23S RNS. Von intakten 5oS (Newton & Brimacombe 1974) und 5oS core-Partikeln (Roth & Nierhaus 1975) wurden durch RNase-Verdauung RNP-Fragmente hergestellt. Proteine, die zusammen in sehr kleinen RNP-Fragmenten auftreten, sind wahrscheinlich in den Ribosomen benachbart. Danach ergeben sich für L1-L9, L1-L23, L3-L4-L24, L5-L8 (bzw. L5-L8-L25) enge Nachbarschaftsbeziehungen. In größeren RNP-Fragmenten waren L3, L4, L5, L8/9, L18, L24 in der Nähe von L1-L23 und L5, L13, L17, L18, L19, L2o, L21, L22, L28, L29 in der Nähe von L3-L4-L24 gebunden.

Diese Versuche deuten darauf hin, daß die im quervernetzten EF-Tu·5oS Protein Komplex auftretenden Proteine in intakten Ribosomen nahe beieinander liegen. Daraus kann man schließen, daß möglicherweise nicht alle Proteine direkt an EF-Tu binden, sondern auch innerhalb der 5oS eine Quervernetzung stattgefunden hat. Kenny et al. (1975) finden allerdings keine Quervernetzung zwischen diesen Proteinen bei Verwendung des auch in dieser Arbeit angewandten Quervernetzers. Es ist nicht auszuschließen, daß die Bindung von EF-Tu an die Ribosomen deren Konformation so verändert, daß erst durch die Bindung des Faktors die Proteine in die für die Quervernetzung notwendige Nähe zueinander geraten.

Eine Entscheidung darüber, ob die fünf identifizierten Proteine direkt oder indirekt (d.h. über ein Nachbarprotein) an den EF-Tu binden, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht getroffen werden.

4. Vergleich der mit dem Quervernetzungsreagenz erhaltenen Ergebnisse mit den aus Funktionsanalysen erhaltenen Resultaten

Aus Versuchen mit core-Partikeln und Rekonstitutionsexperimenten (Kischa et al. 1971; Hamel & Nakamoto 1972; Hamel et al. 1972; Sander et al. 1972; Sopori & Lengyel 1972; Weissbach et al. 1972; Schrier et al. 1973; Schrier & Möller 1975), Antibiotika-Experimenten (Bodley & Lin 197o; Bodley et al. 197oa; Pestka 197o; Tanaka et al. 197o; Weisblum & Demohn 197oa; Weisblum & Demohn 197ob; Highland et al. 1971; Kinoshita et al. 1971; Modolell et al. 1971a; Modolell et al. 1971b), Antikörperexperimenten (Highland et al. 1971, 1973; Thammana et al. 1973; Lelong et al. 1974; Stöffler 1974), Hemmung der Bindung von EF-Tu an die Ribosomen durch vorgebundenen EF-G (und umgekehrt) (Cabrer et al. 1972; Miller 1972; Richman & Bodley 1972; Richter 1972; Modolell & Vasquez 1973; Kleinert & Richter 1975) wurde der Schluß gezogen, daß EF-Tu und EF-G eine sehr stark überlappende oder sogar die gleiche Bindungsstelle an den Ribosomen besitzen. Als Kandidaten für die Überlappungsstelle werden L7/L12 genannt. Die Proteine L7/L12 traten in dem quervernetzten EF-Tu·5oS Protein Komplex nicht auf. Lediglich das Ergebnis, daß Anti-L7/L12 auch die (unabhängig von der EF-Tu abhängigen) nicht-enzymatische Anlagerung von aa-tRNS an die Ribosomen hemmt (Stöffler 1974) weist darauf hin, daß L7/L12 bei der Bindung der Faktoren nicht die vorrangige Rolle einnehmen können, die ihnen im allgemeinen zugeschrieben wird.

Die Proteine L4 und L14, durch deren Antikörper die EF-Tu und EF-G abhängigen Reaktionen gehemmt werden, waren ebenfalls nicht in dem mit EF-Tu quervernetzten Proteingemisch vorhanden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund überein, daß auch die nicht-enzymatische Bindung von aa-tRNS an die Ribosomen durch Anti-L4 und Anti-L14 gehemmt wird (Stöffler 1974).

Diese Ergebnisse liefern einen Beitrag zur Aufklärung der topographischen Struktur der Ribosomen. Es konnte gezeigt werden, welche Proteine die EF-Tu Bindungsstelle an den 50S Untereinheiten bilden bzw. in naher Nachbarschaft dieser Bindungsstelle liegen. Durch Bestimmung der quervernetzten Aminosäuren der in dieser Arbeit identifizierten Proteine und deren Lokalisation auf den Ribosomen kann in naher Zukunft die Topographie der Ribosomen während eines Teilschrittes der Elongation aufgeklärt werden.

IV. Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Proteine der 50S Untereinheiten zu identifizieren, die die EF-Tu Bindungsstelle bilden bzw. in naher Nachbarschaft dieser Bindungsstelle liegen. Dazu wurde der Ribosomen·EF-Tu Komplex mit Methyl-4-Mercapto-Butyrimidat quervernetzt. Dieses Quervernetzungsreagenz hat eine Länge von 14 Å. Es bindet an freie Aminogruppen von Proteinen. Der Quervernetzer enthält eine freie SH-Gruppe. Nach Bindung des Quervernetzers an die Proteine und anschließender Oxydation bilden benachbarte SH-Gruppen Disulfidbrücken. Dadurch werden Proteine, die in den Ribosomen in räumlicher Nähe zusammen liegen, kovalent miteinander verbunden.

Zur Quervernetzung von EF-Tu mit 50S Proteinen wurde der EF-Tu und die 50S Proteine getrennt mit dem Quervernetzungsreagenz behandelt und zunächst unter reduktiven Bedingungen gehalten. Aus mit MBID behandeltem EF-Tu ($EF\text{-}Tu_{SH}$), behandelten und radioaktiven 50S Untereinheiten ($(^{3}H)50S_{SH}$), unbehandelten 30S Untereinheiten ($30S_{n}$), Poly-U, GMP-PCP und (^{14}C)Phe-tRNS wurde der Ribosomen·EF-Tu Komplex gebildet, der anschließend oxydiert wurde. Nach der Oxydation wurden alle ribosomalen Proteine mit Essigsäure extrahiert. Durch Affinitätschromatographie über Sepharose, an die gegen EF-Tu gerichtete Antikörper gebunden waren, wurden die mit EF-Tu quervernetzten Proteine von den übrigen ribosomalen Proteinen getrennt und isoliert. Nach Spaltung der kovalenten Bindungen durch Reduktion wurden die in dem quervernetzten Komplex enthaltenen Proteine mit Hilfe der zwei-dimensionalen Harnstoff-Gelelektrophorese identifiziert.

In dem quervernetzten 50S Protein·EF-Tu Komplex wurden die Proteine der ribosomalen 50S Untereinheiten L1, L3, L23, L24 und L28 nachgewiesen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß sich diese fünf ribosomalen Proteine in (oder in der Nähe) der Ribosomenbindungsstelle für den EF-Tu befinden, und daß sie wenigstens mit einem Abschnitt ihrer Proteinkette nicht weiter als 14 Å vom gebundenen EF-Tu entfernt lokalisiert sind.

V. Literaturverzeichnis

Acharya A.S.; P.B. Moore; F.H. Richards
Cross-Linking of Elongation Factor EF-G to the 5oS Ribosomal Subunit of Escherichia coli
Biochem. 12, 31o8-3114,(1973)

Arai K.J.; M. Kawakita; Y. Kaziro
Studies on Polypeptide Elongation Factors from Escherichia coli
J. Bio. Chem. 247, 7o29-7o37,(1972)

Arai K.J.; M. Kawakita; S. Nishimura; Y. Kaziro
Crystallization of phenylalanin-tRNA^{Phe} - EF-Tu - GTP complex
Biochim. Biophys. Acta 324, 44o-445, (1973)

Bodley T.W.; C. Lin; T.H. Highland
Studies on Translocation VI: Thiostrepton prevents the formation of a ribosome-G factor-guanine nucleotide complex
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 14o6-1411, (197o)

Bodley J.W.; L. Lin
Interaction of E. coli G Factor with the 5oS Ribosomal Subunit
Nature 227, 6o-61, (197o)

Brot N.; E. Yamasaki; B. Redfield; H. Weissbach
The Properties of an E. coli Ribosomal Protein Required for the Function of Factor G
Arch. Biochem. Biophys. 148, 148-155 (1972)

Cabrer B.; D. Vázquez; J. Modolell
Inhibition by Elongation Factor EF G of Aminoacyl-tRNA Binding to Ribosomes
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 733-736, (1972)

Clegg C.; D. Hayes
Identification of Neighbouring Proteins in the Ribosomes of Escherichia coli. A Topographical Study with the Cross-Linking Reagent Dimethyl Suberimidate
Eur. J.Biochem. 42, 21-28, (;974)

Conway T.W.
On the role of ammonium or potassium ion in amino acid polymerization
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 1216-122o, (1964)

Crichton R.R.; H.G. Wittmann
Ribosomal Proteins XXIV. Trypsin Digestion as a Possible Probe of the Conformation of Escherichia coli Ribosomes
Mol. Gen. Genet. 114, 95-1o5, (1971)

Cuatrecasas P.; C.B. Anfinsen
Affinity Chromatography
Annu. Rev. Biochem. 4o, 259-278, (1971)

Eilat D.; M. Pellegrini; H. Oen; Y. Lapidot; C.R. Cantor
A Chemical Mapping Technique for Exploring the Location of Proteins along the Ribosome-bound Chain
J. Mol. Biol. 88, 831-84o, (1974)

Ertel R.; B. Redfield; N. Brot; H. Weissbach
Role of GTP in Protein Synthesis: Interaction of GTP with Soluble Transfer Factors from E. coli
Arch. Biochem. Biophys. 128, 331-338, (1968)

Expert-Bezançon A.; D. Barritault
Protein neighbourhoods in E. coli ribosome subunit
Federation of European Biochemical Societies in Paris, Abstract No 443, (1975)

Garrett R.A.; S. Müller; P. Spierer; R.A. Zimmermann
Binding of 5oS Ribosomal Subunit Proteins to 238 RNA of Escherichia coli
J. Mol. Biol. 88, 553-557, (1974)

Gordon J. Interaction of guanosine 5' - triphosphate with a supernatant fraction from E. coli and aminoacyl-sRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 1574-1578, (1967)

Gordon J. A stepwise reaction yielding a complex between a supernatant fraction from E. coli , guanosine 5'-Triphosphate, and aminoacyl-sRNA
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 179-183, (1968)

Gordon J. Hydrolysis of Guanosine 5'-Triphosphate Associated with Binding of Aminoacyl-Transfer Ribonucleic Acid to Ribosomes
J. Biol. Chem. 244, 5680-5686, (1969)

Gordon J.; J. Lucas-Lenard; F. Lipmann
Isolation of Bacterial Chain Elongation Factors
in: Methods in Enzymology, Herausgeber: S.P. Colowick und N.C. Kaplan, Band XX, 281-291, (1971)

Haenni A.-L.; J. Lucas-Lenard
Stepwise synthesis of a tripeptide
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61, 1363-1369, (1968)

Haenni A.-L.; J. Lucas-Lenard; J. Gordon
Function of the T-GTP-aminoacyl-sRNA complex in polypeptide formation
Fed. Proc. 27, 397 Abstr.1032, (1968)

Hamel E.; M. Koka; T. Nakamoto
Requirement of an Escherichia coli 50S Ribosomal Protein Component for Effective Interaction of the Ribosome with T and G Factors and with Guanosine Triphosphate
J. Biol. Chem. 247, 8005-814, (1972)

Hamel E.; T. Nakamoto
Studies on the Role of an Escherichia coli 50S Ribosomal Component in Polypeptide Chain Elongation
J. Biol. Chem. 247, 6810-6817, (1972)

Haselkorn R.; L.B. Rothman-Denes
Protein synthesis
Ann. Rev. Biochem. 42, 397-438, (1973)

Haseltine W.A.; R. Block; W. Gilbert; K. Weber
MS I and MS II made on Ribosome in Idling Step of Protein Synthesis
Nature 238, 381-384, (1972)

Highland J.H.; L. Ling; J.W. Bodley
Protection of Ribosomes from Thiostrepton Inactivation by the Binding of G Factor and Guanosine Diphosphate
Biochem. 10, 4404-4409, (1971)

Highland J.H.; J.W. Bodley; J. Gordon; R. Hasenbank; G. Stöffler
Identity of the Ribosomal Proteins Involved in the Interaction with Elongation Factor G.
Proc. Nat. Acad. Sci. 7o, 147-15o, (1973)

Highland J.H.; E. Ochsner; J. Gordon; J.W. Bodley; R. Hasenbank; G. Stöffler
Coordinate Inhibition of Elongation Factor G Function and Ribosomal Subunit Association by Antibodies to Several Ribosomal Proteins
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 627-63o, (1974)

Homann H.E.; K.H. Nierhaus
Ribosomal Proteins: Protein Compositions of Biosynthetic Precursors and Artificial Subparticles from Ribosomal Subunits in Escherichia coli K12
Eur. J. Biochem. 2o, 249-257, (1971)

Hunter M.J.; M.L. Ludwig
The Reaction of Imidoesters with Proteins and Related Small Molecules
J. Am. Chem. Soc. 84, 3491-35o4, (1962)

Kaltschmidt E.; H.G. Wittmann
Ribosomal Proteins. VII Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Fingerprinting of Ribosomal Proteins
Analyt. Biochem. 36, 4o1-412, (197o)

Kaltschmidt E.; H.G. Wittmann
Ribosomal Proteins. XXXII Comparison of several extraction methods for proteins from Escherichia coli ribosomes
Biochimie 54, 167-175, (1972)

Kazemie M.
The Importance of Escherichia coli Ribosomal Proteins L1, L11 and L16 for the Association of Ribosomal Subunits and the Formation of the 7oS Initiation Complex
Eur. J. Biochem. 58, 5o1-51o, (1975)

Kenny J.W.; A. Sommer; R.R. Traut
Cross-linking Studies on the 5oS Ribosomal Subunit of Escherichia coli with Methyl-4-Mercaptobutyrimidate
J. Biol. Chem. 25o, 9434-9436, (1975)

Kinoshita T.; Y.-F. Liou; N. Tanaka
Inhibition by thiostrepton of ribosomal functions associated with T and G factors
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 859-863, (1971)

Kischa K.; W. Möller; G. Stöffler
Reconstitution of a GTPase Activity by a 5oS Ribosomal Protein from Escherichia coli
Nature New Biol. 233, 62-63, (1971)

Kleinert U.; D. Richter
The binding of the pyrophosphoryltransferase and the elongation factor Tu and G to ribosomes from Escherichia coli
FEBS Lett. 55, 188-193, (1975)

Kurland C.G.
Functional Organization of the 3oS Ribosomal Subunit in: Ribosomes, Herausgeber: M. Nomura, A. Tissières, P. Lengyel; Cold Spring Harbor (New York), 3o9-331, (1974)

Lelong J.C.; D. Gros; F. Gros; A. Bollen; R. Maschler; G. Stöffler
Function of Individual 3oS Subunit Proteins of E. coli. Effect of Specific Immunoglobin Fragments (Fab) on Acitivities of Ribosomal Decoding Sites
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 248-252, (1974)

Lucas-Lenard J.; A.-L. Haenni
Requirement of Guanosine 5'-Triphosphate for Ribosomal Binding of Aminoacyl-sRNA
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 554-56o, (1968)

Lucas-Lenard J.; P. Tao; A.-L. Haenni
Further Studies on Bacterial Polypeptide Elongation
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 455-462, (1969)

Lucas-Lenard J.; F. Lipmann
Protein Biosynthesis
Ann. Rev. Bioch. 4o, 4o9-448, (1971)

March St.C.; I. Parikh; P. Cuatrecasas
A Simplified Method for Cyanogen Bromide Activation of Agarose for Affinity Chromatography
Analyt. Biochem. 6o, 149-152, (1974)

Maruta H.; T. Tsuchiya; D. Mizuno
In vitro Reassembly of Functionally Active 5oS Ribosomal Particles from Ribosomal Proteins and RNS's of Escherichia coli
J. Mol. Biol. 61, 123-134, (1971)

Means G.E.; R.E. Feeney
Reductive Alkylation of Amino Groups in Proteins
Biochem. 7, 2192-22o1, (1968)

Miller D.L.
Elongation Factors EF-Tu and EF-G Interact at Related Sites on Ribosomes
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 752-755, (1972)

Mizushima S.; M. Nomura
Assembly Mapping of 3oS Ribosomal Proteins from E. coli
Nature 226, 1214-1218, (197o)

Modolell J.; B. Cabrer; A. Parmeggiani; D. Vazqzez
Inhibition by Siomycin and Thiostrepton of Both Aminoacyl-tRNA and Factor G Binding to Ribosomes
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1796-18oo, (1971a)

Modolell J.; D. Vazquez; R.E. Monro
Ribosomes, G-factor and Siomycin
Nature New Biol. 23o, 1o9-112, (1971b)

Modolell J.; D. Vazquez
Inhibition by Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid of Elongation Factor G-dependent Binding of Guanosine Nucleotide to Ribosomes
J. Biol. Chem. 248, 488-493, (1973)

Moore G.; R.R. Crichton
Reductive methylation: A method for preparing functionally active radioactive ribosomes
FEBS Lett. 37, 74-78, (1973)

Moore P.B.; D.M. Engelman; P.B. Schoenborn
Neutron Scattering Studies of the E. coli Ribosome
in: Ribosomes, Herausgeber: M. Nomura; A. Tissières; P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York) 1974
601-613

Morgan J.; R. Brimacombe
A Preliminary Three-Dimensional Arrangement of the Proteins in the Escherichia coli 30S Ribosomal Subunit
Eur. J. Biochem. 37, 472-480, (1973)

Morrison C.A.; R.A. Garrett; H. Zeichhardt; G. Stöffler
Proteins Occurring at, or Near the Subunit Interface of E. coli Ribosomes
Mol. Gen. Genet. 127, 359-368, (1973)

Nierhaus K.H.; K. Bordasch; H.E. Homann
Ribosomal Proteins. XLIII In vivo Assembly of Escherichia coli Ribosomal Proteins
J. Mol. Biol. 74, 587-597, (1973)

Nierhaus K.H.; F. Dohme
Total Reconstitution of Functionally Active 50S Ribosomal Subunits from Escherichia coli
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 4713-4717, (1974)

Nirenberg M.W.; J.H. Matthaei
The Dependence of cell-free Protein Synthesis in E. coli upon Naturally occurring or synthetic polyribonucleotides
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 1588-1602, (1961)

Nishizuka Y.; F. Lipmann; J. Lucas-Lenard
Isolation and Properties of the Escherichia coli Amino Acid Polymerizing Enzymes
in: Methods in Enzymology, Herausgeber: S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Band XII, 708-721, (1968)

Oakes J. Magnetic-Resonance Studies of the Interactions between Bovine-Serum Albumin and Surfactants
1. Nature of Binding Site
Eur. J. Biochem. 36, 553-558, (1973)

Ono Y.; A. Skoultchi; J. Waterson; P. Lengyel
Peptide Chain Elongation: GTP Cleavage catalysed by Factors binding Aminoacyl-Transfer RNA to the Ribosome
Nature 222, 645-648, (1969)

Ouchterlony Ö.
Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis
Ann. Arbor Science Publishers (1968), 47-59

Parmeggiani A.; C. Singer; E.M. Gottschalk
Purification of the Amino Acid Polymerization Factors from Escherichia coli
in: Methods in Enzymology, Herausgeber: S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Band XX, 291-3o2, (1968)

Pestka S. Thiostrepton: A Ribosomal Inhibitor of Translocation
Biochim. Biophys. Res. Commun. 4o, 667-674, (197o)

Pongs O.; R. Bald; V.A. Erdmann
Identification of Chloramphenicol-Binding Protein in Escherichia coli Ribosomes by Affinity labelling
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 7o, 2229-2233, (1973)

Putnam F.W.; H. Neurath
Interaction between proteins and synthetic Detergens II. Electrophoretic analysis of serum albumin-sodium dodecyl sulfate mixtures
J. Biol. Chem. 159, 195-2o9, (1954)

Ravel J.M.; R.L. Shorey; W. Shive
The composition of the active intermediate in the transfer of aminoacyl-tRNA to ribosomes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 9-14, (1968)

Reynolds J.A.; J.P. Gallagher; J. Steinhardt
Effect of pH on the Binding of N-Alkyl Sulfates to Bovine Serum Albumin
Biochem 9, 1232-1238, (197o)

Richman N.; J.W. Bodley
Ribosomes can not Interact Simultaneously with Elongation Factors EF-Tu and EF-G
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 686-689, (1972)

Richter D.
Inability of E. coli ribosomes to interact simultaneously with the bacterial elongation factors EF-Tu and EF-G
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 185o-1856, (1972)

Sander G.; R.C. Marsh; A. Parmeggiani
Isolation and characterization of two acidic proteins from the 5oS subunit required for GTPase activities of both EF G and EF T
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 866-873, (1972)

Schrier P.I.; J.A. Maassen; W. Möller
Involvement of 5oS ribosomal proteins L6 and L1o in the ribosome dependent GTPase activity of elongation factor G
Biochem. Biphys. Res. Commun. 53, 9o-98, (1973)

Schrier P.I.; W. Möller
The Involvement of 5oS Ribosomal Protein L11 in the EF-G Dependent GTP-Hydrolysis of E. coli Ribosomes
FEBS Lett. 54, 13o-134, (1975)

Schütte E.
Guanylierung von Proteinen
Z. Physiol. Chem. 279, 59-61, (1943)

Shorey R.L.; J.M. Ravel; C.W. Garner; W. Shive
Formation and Properties of the Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid-Guanosie Triphosphate-Protein Complex
J. Biol. Chem. 244, 4555-4564, (1969)

Skoultchi A.; Y. Ono; J. Waterson; P. Lengyel
Peptide Chain Elongation
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 437-454, (1969)

Skoultchi A.; Y. Ono; J. Waterson; P. Lengyel
Peptide Chain Elongation: Indications for the Binding of an Amino Acid Polymerization Factor, Guanosine 5'-Triphosphate-Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid Complex to the Messenger-Ribosome Complex
Biochem. 9, 5o8-514, (197o)

Sopori M.L.; P. Lengyel
Components of the 5oS ribosomal subunit involved in GTP cleavage
Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 238-244, (1972)

Spirin A.S.; O.E. Kostlashrina; J. Jonák
Contribution of the Elongation Factors to Resistance of Ribosomes Against Inhibitors: Comparison of the Effects on the Factor-dependent and Factor-free Translation Systems
J. Biol. Chem. 1o1, 553-562, (1976)

Spitnik-Elson P.; A. Breiman
The Effect of Trypsin on 3oS and 5oS Subunits of Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta 254, 457-467, (1971)

Stöffler G.
Structure and Function of the Escherichia coli Ribosome: Immunochemical Analysis
in: Ribosomes, Herausgeber: M. Nomura; A. Tissières; P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), S. 615-667, (1974)

Stöffler G.; G.W. Tischendorf
Antibiotic Receptor-Sites in Escherichia coli Ribosomes
in: Topics in Infections Diseases, Band 1, "Drug-Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy", S. 117-143, (1973), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Tanaka K.; S. Watanaba; H. Teraoka; M. Tannaki
Effect of Siomycin on protein synthesizing activity of Escherichia coli ribosomes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 1189-1193, (197o)

Thammana P.; C.G. Kurland; E. Deusser; J. Werber; R. Maschler
Structural and Functional Evidence for a Repeated 5oS Subunit Ribosomal Protein
Nature New Biology 242, 47-49, (1973)

Terhorst C.; W. Möller; R. Laursen; B. Wittmann-Liebold
The Primary Structure of an Acidic Protein from 50S Ribosomes of Escherichia coli which is Involved in GTP Hydrolysis Dependent on Elongation Factors G and T
Eur. J. Biochem. 34, 138-152, (1973)

Tischendorf G.W.; H. Zeichhardt; G. Stöffler
Architecture of the Escherichia coli ribosome as determined by immune electron microscopy
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 4820-4824, (1975)

Traub P.; M. Nomura
Structure and Function of E. coli Ribosomes V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Protein
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 59, 777-784, (1968)

Traut R.R.; A. Bollen; T.-T. Sun; J.W.B. Hershey; J. Sundberg; R.L. Pierce
Methyl-4-Mercaptotutyrimidate as a Cleavable Cross-Linking Reagent and Its Application to the Escherichia coli 30S Ribosome
Biochem. 12, 3266-3273, (1973)

Traut R.R.; R.L. Heimark; T.-T. Sun; J.W.B. Hershey; A. Bollen
Protein Topography of Ribosomal Subunits from Escherichia coli
in: Ribosomes, Herausgeber: M. Nomura; A. Tissières, P. Lengyel. Cold Spring Harbor (New York) S.271-308, (1974)

Wabl M.R.; H.G. Doberer; S. Höglund; L. Ljung
Electron microscopic study of isolated 30S ribosomal subunits of Escherichia coli
Cytobiologie 7, 111-115, (1973)

Weber K.; M. Osborn
The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412, (1969)

Weisblum B.; V. Demohn
Thiostrepton, an Inhibitor of 5oS Ribosome Subunit Function
J. Bacteriol. 1o1, 1o73-1o75, (197oa)

Weisblum B.; V. Demohn
Inhibition by thiostrepton of the formation of a ribosome-bound guanine nucleotide complex
FEBS Lett. 11, 149-152, (197ob)

Weissbach H.; B. Redfield; E. Yamasaki; R.C. Davis; S. Pestka; N. Brot
Studies on the Ribosomal Sites Involved in Factors Tu- and G-Dependent Reactions
Arch. Biochm. Biophys. 149, 11o-117, (1972)

Wittmann H.G.; B. Wittmann-Liebold
Chemical Structure of Bacterial Ribosomal Proteins
in: Ribosomes, Herausgeber: M. Nomura; A. Tissières; P. Lengyel, Cold Spring Harbor (New York), S.115-14o (1974)

Wittmann H.G.
Structure, Function and Evolution of Ribosomes
Eur. J. Biochem. 61, 1-13, (1976)

Wittmann-Liebold B.; M. Dizionara
Comparison of amino acid sequences among ribosomal proteins of Escherichia coli
FEBS Lett. 61, 14-19, (1976)

Wold F. Bifunctional Reagents
in: Methods in Enzymology, Herausgeber: S.P. Colowick und N.C. Kaplan, Band XI, S. 617-64o, (1967)

Zeichhardt H.
Immunochemische Untersuchungen zur Topographie der Proteine im Ribosom von Escherichia coli
Dissertation an der Freien Universität Berlin (1976)

Zimmermann R.A.
RNA-Protein Interactions in the Ribosome
in: Ribosomes, Herausgeber M. Numura; A. Tissières; P. Lengyel; Cold Spring Harbor (New York), S. 225-269, (1974)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn

Prof. Dr. H. G. Wittmann

am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Wittmann danke ich für seine fördernde Kritik und stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für hilfreiche Diskussionen und für Anleitung bei der Reinigung und radioaktiven Markierung von EF-Tu sowie der Bestimmung der biologischen Aktivität des Elongationsfaktors.

Herrn Dr. Sorg danke ich für die Präparation des Antiserums gegen EF-Tu.

L e b e n s l a u f

Ursula Fabian, geb. Kleinert

27.2.195o	geboren in Berlin
1956 - 1962	Besuch der Grundschule in Berlin
1962 - 1969	Besuch der Gottfried-Keller-Schule (neusprachliches Gymnasium) in Berlin
1969	Abitur
1969 - 1973	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin 1971 Vordiplom 1972 Studienaufenthalte in: München (Max-Planck-Institut für Zellchemie, Prof. Dr. F. Lynen); Utrecht (Institut für vergleichende Tierphysiologie der Reichsuniversität Utrecht, Dr. P. A. Voogt); Karlsruhe (Kernforschungszentrum). Diese Aufenthalte wurden durch Stipendien der Dr. Carl Duisberg-Stiftung und des Fachbereichs Biologie der Freien Universität Berlin unterstützt. 1973 Diplom am Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin
1973	Beginn der Doktorarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. G. Wittmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin.

F. Höpfner - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198